

Université de Sherbrooke

**Régulation de l'expression génique des chimiokines chez les neutrophiles  
humains : Étude des facteurs de transcription AP-1 et C/EBP**

par  
Alexandre Cloutier

Programme d'Immunologie  
Faculté de Médecine  
Laboratoires de Dr. Patrick P. McDonald et de Dr. Pierre Larivée

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.) en Immunologie

Le 15 septembre 2003



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

Acquisitions et  
services bibliographiques

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 0-612-90592-6*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 0-612-90592-6*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

**Canada**

## Table des Matières

<b>Table des Matières .....</b>	<b>II</b>
<b>Liste des illustrations .....</b>	<b>III</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>V</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>2</b>
1. Aspect général de l'inflammation .....	2
2. Historique de l'inflammation.....	2
3. La réaction inflammatoire.....	3
4. Les chimiokines .....	5
4.1 Rôles physiologiques.....	9
4.1.2 Les chimiokines de maintenance ou homéostatiques .....	9
4.1.3 Les chimiokines inflammatoires.....	10
4.2 Les récepteurs de chimiokines .....	11
5. Régulation transcriptionnelle des chimiokines inflammatoires.....	13
5.1 Le facteur transcriptionnel NFκB.....	15
5.2 Le facteur transcriptionnel AP-1 .....	18
5.3 Les facteurs de transcription C/EBP.....	20
6. Les neutrophiles .....	25
6.1 Fonctions classiques .....	26
6.2 Génération de cytokines et chimiokines par les neutrophiles .....	28
<b>Objectifs de l'étude.....</b>	<b>32</b>
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>33</b>
<b>Résultats et Discussion .....</b>	<b>38</b>
<b>Section 1. L'expression des cytokines inflammatoires chez les neutrophiles humains est indépendante de la voie de signalisation JNK/AP-1 .....</b>	<b>38</b>
<b>Section 2. Étude des facteurs transcriptionnels C/EBP chez les neutrophiles .....</b>	<b>58</b>
<b>Discussion et Conclusion générale .....</b>	<b>69</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>72</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>73</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>90</b>

## Liste des illustrations

### Figures :

#### Introduction :

Figure 1. Résumé la réaction inflammatoire.....	5
Figure 2. Représentation de quatre importantes fonctions biologiques des chimiokines.....	6
Figure 3. Mécanismes d'activation du NFκB.....	17
Figure 4. Représentation schématique des membres de la famille C/EBP.....	22
Figure 5. Cytokines et chimiokines produites par les neutrophiles humains et leurs cellules-cibles.....	30

#### Résultats et discussion

#### Section 1 :

Figure 1. Expression et stabilité des protéines des familles Jun/Fos chez les neutrophiles (pmn).....	50
Figure 2. Effet d'agonistes sur les quantités cellulaires et sur la localisation des protéines Jun/Fos chez les neutrophiles (pmn).....	51
Figure 3. Effet d'agonistes sur la liaison d'AP-1 à l'ADN et sur l'activité de JNK1 chez les pmn.....	52
Figure 4. Faible activation de JNK1 et absence de c-Jun phosphorylé dans des conditions permettant une modeste induction de la liaison à un site AP-1.....	53
Figure 5. Induction et identification d'une activité liant un site AP-1 ne survient que dans des conditions très particulières, et demeure modeste.....	54
Figure 6. Effet de l'inhibition de JNK sur l'expression des cytokines/ chimiokines inflammatoires.....	55
Figure 7. Effet de l'inhibition de JNK sur la synthèse et la sécrétion des cytokines et chimiokines inflammatoires chez les neutrophiles.....	56
Figure 8. Expression de Ref-1 chez les neutrophiles primaires et durant la différenciation granulocytaire d'un lignée cellulaire promyéloïde humaine.....	57

## Section 2 :

**Figure 1. Expression des protéines de la famille des C/EBP chez les neutrophiles (pmn) et effet de diverses stimulation sur leurs quantités cellulaires..... 65**

**Figure 2. Effet d'agonistes sur la localisation des protéines C/EBP chez les neutrophiles (pmn)..... 66**

**Figure 3. Induction d'une activité liant un site C/EBP suite à une stimulation chez les neutrophiles (pmn) ..... 67**

**Figure 4. Induction d'une activité liant un site C/EBP et NFkB suite à une stimulation au LPS chez les PLB-985 non différenciées..... 68**

## Tableaux :

**Tableau 1. Les chimiokines et leurs récepteurs : ..... 8**  
nouvelle et ancienne nomenclature

**Tableau 2. Niveau de régulation des C/EBP.....24**

**Liste des abréviations**

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	Protéine activatrice 1
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	Albumine sérique de bovin
C3a	Protéine du complément 3a
C5a	Protéine du complément 5a
C/EBP	Protéines liant la séquence activatrice CCAAT
CBP	Protéine liant CREB
CRE	Élément de réponse à l'AMPc
CREB	Protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc
fMLP	Peptide Methionine-Leucine-Phenylalanine N-Formylé
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
h	Heure
IL	Interleukine
LPS	Lipopolysaccharide
min	Minute
MIP-1	Protéine inflammatoire agissant sur les macrophages
MAPK	Protéines kinases activées par des mitogènes
NFκB	Facteur nucléaire kappa B
ng	Nanogramme
PAF	Facteur activateur des plaquettes
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>

PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PMA	Ester de phorbol (phorbol acetate myristate)
TBS	Solution de Tris base avec NaCl
TNF- $\alpha$	Facteur nécrosant les tumeurs- $\alpha$
TGF- $\beta$	Facteur transformant la croissance- $\beta$
TLR	Récepteurs de type Toll-like
TPA	Ester de phorbol (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)
TRE	Élément de réponse au TPA
$\mu\text{g}$	Microgramme

## Résumé

Les neutrophiles représentent une composante essentielle du système immunitaire inné. Ils jouent un rôle-clé dans la défense de l'organisme contre les infections microbiennes. En plus de leur illustre fonction phagocytaire et de leur capacité à libérer un large éventail de produits antimicrobiens, les neutrophiles produisent également diverses protéines immunomodulatrices, dont une vaste gamme de chimiokines (IL-8, MIP-1 $\alpha$ / $\beta$ , IP-10, I-TAC, etc.). La génération de ces dernières permet le recrutement massif de neutrophiles et d'autres populations leucocytaires au site inflammatoire, contribuant ainsi au déroulement de la réponse inflammatoire.

La génération de chimiokines par les neutrophiles est induite par des agonistes particuliers, des agents chimiotactiques, ou par des médiateurs inflammatoires (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance), et implique l'activation de nombreuses voies de signalisation et de facteurs transcriptionnels. Dans la présente étude, nous avons voulu déterminer l'impact des facteurs de transcription AP-1 et C/EBP dans l'induction de l'expression des chimiokines chez les neutrophiles humains isolés du sang périphérique. L'utilisation de différentes classes d'agonistes et d'inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation nous a permis d'écarter l'implication du facteur AP-1 dans ce processus. Ainsi, malgré la présence de plusieurs protéines de la famille AP-1, et d'une activation de JNK1 dans certaines conditions, la formation d'un complexe authentique AP-1 n'a été observée en aucun cas. Qui plus est, l'inhibition de la voie JNK n'a pas affecté la génération d'IL-8, de MIP-1 $\alpha$  et de MIP-1 $\beta$  induite par le LPS ou le TNF- $\alpha$ . Par ailleurs, l'expression des différents membres de la famille C/EBP, de même que l'activation de ceux-ci par le LPS et le TNF- $\alpha$ , laissent présager un rôle dans l'expression des chimiokines chez le neutrophile.



## **Introduction**

### **1. Aspect général de l'inflammation**

La notion d'inflammation représente un processus physiologique par lequel un organisme répond aux blessures ou aux agents nocifs endogènes ou exogènes, qu'ils soient biologiques ou chimiques. L'inflammation est un processus essentiel au maintien de l'homéostasie et l'initiation d'une réponse inflammatoire a pour but premier d'éliminer l'agent causal de cette atteinte physique. Elle implique la participation de plusieurs médiateurs solubles (pro- et anti-inflammatoires) et de plusieurs types cellulaires, notamment les cellules lésées et les leucocytes. Il arrive parfois que cette réaction soit incontrôlée, engendrant des dommages collatéraux avec comme résultante une destruction massive des tissus environnants. Ainsi la réaction inflammatoire est en quelque sorte une épée de Damoclès. (Paul W.E.,1999; Smith JA.,1994)

### **2. Historique de l'inflammation**

La plus ancienne description de l'inflammation remonte à l'Égypte ancienne. On y a découvert des papyrus décrivant le diagnostic et le traitement d'abcès à la poitrine. Des hiéroglyphes y étaient représentés symbolisant « shememet », ce qui se rapporte à quelque chose de chaud. Au premier siècle, Cornelius Celsus a décrit les signes cliniques typiques de l'inflammation soit la douleur, la rougeur, la chaleur et l'œdème dans un ouvrage colossal (*Celsi de medicina libri*). (Celsus C.,1478) Au 19<sup>e</sup> siècle, Rudolf Virchow a attribué un cinquième signe à l'inflammation soit la perte de fonction. La première observation microscopique du processus inflammatoire a été décrite par Julius Cohnheim dans les années 1800. Depuis, la description de la phagocytose par Ilya

Metchnikoff, de même que la découverte de plusieurs protéines sériques, de médiateurs lipidiques et l'avènement des cytokines et des chimiokines, ont permis d'accroître nos connaissances sur l'inflammation. (Metchnikoff I., 1883) Toutefois, même si son étude est millénaire, il nous reste encore beaucoup à apprendre de ce processus hautement complexe.

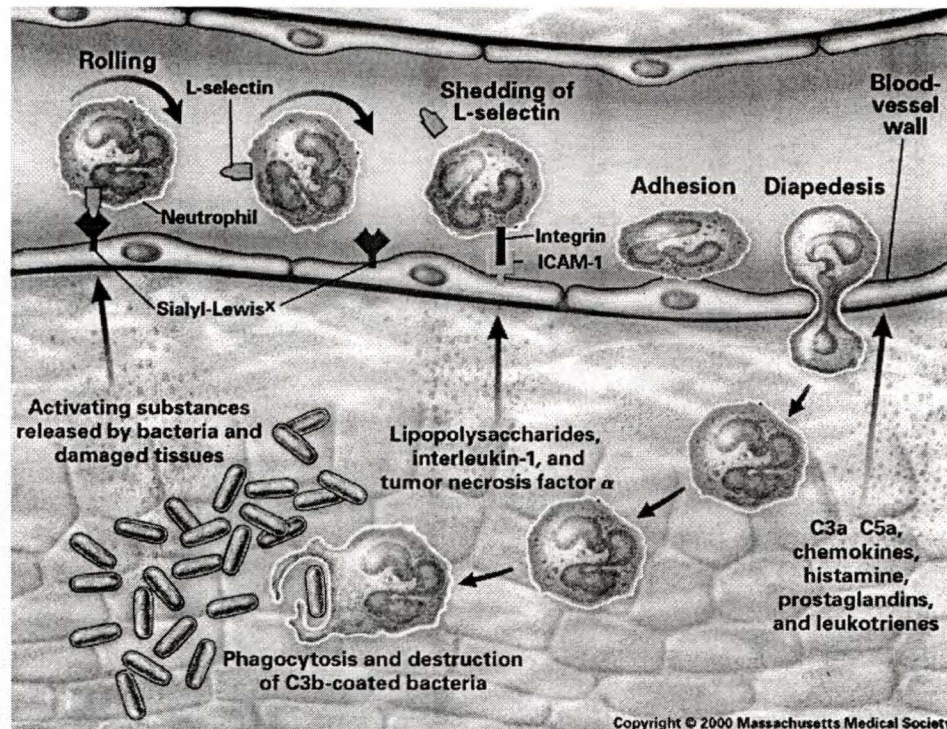
### **3. La réaction inflammatoire**

La réaction inflammatoire implique une phase vasculaire et une phase cellulaire. La première consiste en l'altération de la microvasculature avoisinant le site lésé ou infecté, médiée par moult médiateurs inflammatoires. La cascade d'événements qui en découle sera dictée par la nature de l'agent agresseur. De façon générale, il y a premièrement un changement dans le débit vasculaire : une constriction transiente artériolaire induite par des neuropeptides suivie d'une vasodilatation médiée a priori par des médiateurs inflammatoires emmagasinés tels que l'histamine (mastocytes et basophiles) et la sérotonine (plaquettes). (White M., 1999) Des médiateurs néoformés amplifient le phénomène de vasodilatation tels les kinines, les prostaglandines, les leucotriènes et le facteur activateur des plaquettes (PAF). Ces événements permettent un accroissement de l'afflux sanguin dans les capillaires de la région lésée. Par la suite, une augmentation de la perméabilité vasculaire est observée. Il y a contraction des cellules endothéliales sous l'effet de l'histamine, de la bradykinine, du PAF et des leucotriènes, de même qu'une rétraction des jonctions endothéliales via l'action du  $\text{TNF-}\alpha$  et de  $\text{IL-1}\beta$ . (Blum MS. *et al.*, 1997; Wojciak-Stothard B. *et al.*, 1998). Il y a alors formation d'un œdème tissulaire dû à l'infiltration de liquides et de protéines sériques.

La deuxième phase de la réaction inflammatoire consiste en le recrutement leucocytaire destiné à éliminer les cellules nécrosées et/ou l'agent pathogène (représenté dans la figure1). Ce recrutement est médié par la libération de molécules chimioattractives de classes diverses (plasmatiques, bactériennes, cellulaires) telles que le C3a, le C5a, le fMLP, le LTB<sub>4</sub>, le PAF et l'IL-8. Ces molécules incitent la migration des leucocytes à l'intérieur des vaisseaux sanguins ainsi que le processus de diapédèse, au cours duquel les cellules traversent la paroi des capillaires pour s'accumuler dans les tissus émettant les signaux de l'inflammation. Les premières cellules à migrer de la circulation sanguine vers le tissu lésé ou infecté sont généralement les neutrophiles. (Witko-Sarsat V. *et al.*, 2000) Cette migration s'effectue par une cascade d'adhésions successives initialement décrite pour les neutrophiles mais qui aujourd'hui peut être étendue à l'ensemble des leucocytes. Il y a tout d'abord une adhésion primaire transitoire et réversible sur les cellules endothéliales, un phénomène appelé roulement, qui est médié surtout par les sélectines. Par la suite, il y a activation leucocytaire dépendante des stimuli inflammatoires suivie d'une adhésion ferme et stable à la surface endothéliale, contrôlée par les intégrines. Finalement, il y a passage des neutrophiles à travers la couche de cellules endothéliales via les jonctions intercellulaires, un processus nommé diapédèse. (Muller WA., 2002)

Par la suite, d'autres populations leucocytaires sont recrutées pour permettre l'établissement d'une réponse immunitaire adaptative et l'élimination des pathogènes. Ce sont en bonne partie les chimiokines, du fait de leur diversité, qui organisent le recrutement préférentiel de certains leucocytes en fonction du tissu concerné et des besoins. La finalité de la réponse inflammatoire est la résolution de l'inflammation à

moins qu'il n'y ait persistance de l'agent causal, en pareil cas l'inflammation aiguë se transforme en inflammation chronique.



**Figure 1. Résumé la réaction inflammatoire.**

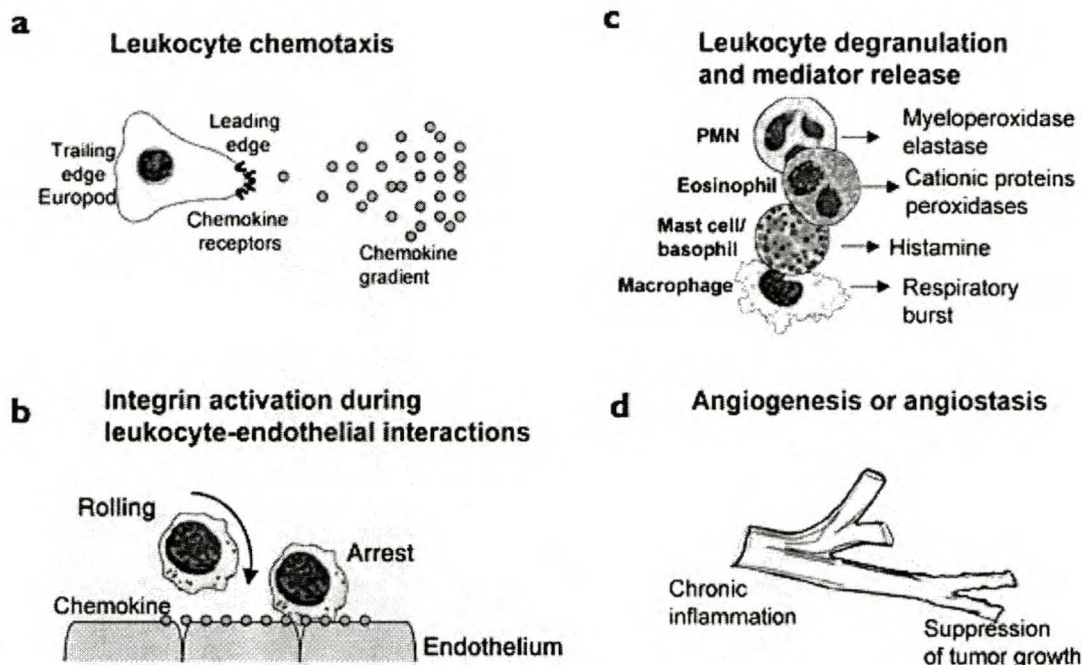
Les neutrophiles sont parmi les premières cellules à être recrutées sur le site d'une infection et contribuent de façon importante à la réponse inflammatoire aiguë. Les neutrophiles roulent le long des vaisseaux sanguins, ils se lient aux cellules endothéliales via des molécules d'adhésion (sélectines). Lorsqu'il y a activation cellulaire, les intégrines sont activées ce qui permet une adhésion ferme. Les neutrophiles activés entrent dans les tissus, où ils sont attirés par des chimioattractants. Les neutrophiles peuvent alors phagocyter, détruire les bactéries mais aussi générer des cytokines et des chimiokines. Extraite et adaptée de Delves PJ. *et al.*, 2000.

#### 4. Les chimiokines

Les chimiokines constituent une vaste famille de petites protéines dont le poids moléculaire oscille entre 8 kDa et 14 kDa, et qui possèdent des fonctions régulatrices importantes dans les réponses immunes (représentées dans la figure 2). Leur rôle premier est le recrutement, lors de l'inflammation, des cellules effectrices de l'immunité aux sites



d'infection et de tissus endommagés. (Rollins BJ., 1997) Ces protéines participent également à la régulation du trafic lymphocytaire, l'angiogénèse, la dégranulation leucocytaire, de même qu'à la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. (Rossi D. *et al.*, 2000; Mackay CR., 2001).



**Figure 2. Représentation de quatre importantes fonctions biologiques des chimiokines.**

(a) Les chimioattractants fournissent des signaux importants pour la mobilité leucocytaire par la formation de gradients que les cellules migratrices peuvent percevoir. (b) Activation des intégrines par les chimiokines durant les interactions leucocyte-cellules endothéliales. (c) Les chimiokines induisent la dégranulation leucocytaire et la libération de médiateurs inflammatoires. Par exemple, CXCL8 (IL-8) stimule l'exocytose des granules des neutrophiles. Les chimiokines stimulent aussi l'explosion respiratoire, résultant en la production d'intermédiaire de réactifs oxygénés. (d) Quelques chimiokines stimulent aussi l'angiogénèse ou l'angiostase. Les chimiokines CXC "ELR" et la CCL2 possèdent des propriétés angiogénique, alors que la CXCL10 (IP-10) et la CCL21 (6Ckine/SLC) possèdent des propriétés angiostatiques. Extraite de Mackay CR., 2001.

Les chimiokines regroupent aujourd'hui une quarantaine de membres identifiés (voir Tableau1). (Wells TN *et al.*, 1997; D'Ambrosio , 2003) La plupart des chimiokines se caractérisent par la présence de quatre cystéines conservées formant deux ponts disulfures entre la première et la troisième cystéine, et entre la deuxième et la quatrième cystéine. Le motif formé par les deux premières cystéines situées à l'extrémité N-terminale constitue le critère de classification. (Baggiolini M. *et al.*,1997) Il existe deux classes principales, à l'intérieur desquelles les membres d'un même groupe montrent une forte similarité de séquence. Il y a la classe des CC-chimiokines, où les deux premières cystéines sont adjacentes, et qui agit principalement sur les monocytes et les lymphocytes T. Il y a ensuite la classe des CXC-chimiokines, dans laquelle les deux premières cystéines sont séparées par un acide aminé quelconque, et dont les cellules cibles principales sont les neutrophiles et les lymphocytes. Les CXC-chimiokines sont encore subdivisées en deux catégories, ELR et non-ELR, définies par la présence ou l'absence d'un motif glutamate-leucine-arginine (ELR) situé avant la première cystéine. À ces deux classes s'ajoutent deux groupes secondaires qui, à ce jour, ne comportent qu'un seul membre chacun. (Kelner GS. *et al.*, 1994; Bazan JF. *et al.*, 1997) La nomenclature initiale très complexe des chimiokines a été normalisée en 2000 avec les dénominations CCL, CXCL, XCL et CX3CL selon la caractéristique de leurs extrémités NH<sub>2</sub> terminales, comme montré dans le tableau 1. (Murphy, P. M *et al.*,2000; Zlotnik A. *et al.*,2000)

**Tableau 1. Les chimiokines et leur récepteurs : nouvelle et ancienne nomenclature**

Noms systématiques	Ligand (anciens noms)	Récepteurs	Rôles physiologiques
<b>Famille des chimiokines de type CXC</b>			
CXCL1	GRO $\alpha$ /MSGA $\alpha$	CXCR2>CXCR1	Inflammatoire
CXCL2	GRO $\beta$ /MSGA $\beta$	CXCR2	Inflammatoire
CXCL3	GRO $\gamma$ /MSGA $\gamma$	CXCR2	Inflammatoire
CXCL4	PF4	Inconnu	Inconnu
CXCL5	ENA-78	CXCR2	Inconnu
CXCL6	GCP-2	CXCR1,CXCR2	Inconnu
CXCL7	NAP-2	CXCR2	Inconnu
CXCL8	IL-8	CXCR1,CXCR2	Inflammatoire
CXCL9	Mig	CXCR3	Inflammatoire
CXCL10	IP-10	CXCR3	Inflammatoire
CXCL11	I-TAC	CXCR3	Inflammatoire
CXCL12	SDF-1 $\alpha/\beta$	CXCR4	Inconnu
CXCL13	BLC/BCA-1	CXCR5	Homéostatique
CXCL14	BRAK	Inconnu	Homéostatique
CXCL15	Inconnu	Inconnu	Inconnu
CXCL16	Inconnu	CXCR6	Inflammatoire
<b>Famille des chimiokines de type C</b>			
XCL1	Lymphotactine	XCR1	Inconnu
XCL2	SCM1- $\alpha$	XCR1	Inconnu
<b>Famille des chimiokines de type CXC3</b>			
CXC3CL1	Fractalkine	CX3CR1	Inflammatoire
<b>Famille des chimiokines de type CC</b>			
CCL1	I-309	CCR8	Inflammatoire
CCL2	MCP-1/MCAF	CCR2	Inflammatoire
CCL3	MIP-1 $\alpha$ /LD78 $\alpha$	CCR1,CCR5	Inflammatoire
CCL4	MIP-1 $\beta$	CCR5	Inflammatoire
CCL5	RANTES	CCR1,CCR3,CCR5	Inflammatoire
CCL6	Inconnu	Inconnu	Inconnu
CCL7	MCP-3	CCR1,CCR2,CCR3	Inflammatoire
CCL8	MCP-2	CCR3	Inflammatoire
CCL9	Inconnu	Inconnu	Inconnu
CCL10	Inconnu	Inconnu	Inconnu
CCL11	Éotaxine	CCR3	Inflammatoire
CCL12	Inconnu	CCR2	Inconnu
CCL13	MCP-4	CCR2,CCR3	Inflammatoire
CCL14	HCC-1	CCR1	Inconnu
CCL15	HCC-2/Lkn-1	CCR1,CCR3	Inconnu

CCL16	HCC-4/LEC	CCR1	Inconnu
CCL17	TARC	CCR4	Inflamm., homéo.
CCL18	DC-CK1/PARC	Inconnu	Homéostatique
CCL19	MIP-3 $\beta$ /ELC	CCR7	Homéostatique
CCL20	MIP-3 $\alpha$	CCR6	Inflamm., homéo,
CCL21	6Ckine/SLC	CCR7	Homéostatique
CCL22	MDC/STCP-1	CCR4	Inflamm., homéo.
CCL23	MPIF-1	CCR1	Inconnu
CCL24	MPIF-2/Éotaxine-2	CCR3	Inflammatoire
CCL25	TECK	CCR9	Homéostatique
CCL26	Éotaxine-3	CCR3	Inflammatoire
CCL27	CTACK/ILC	CCR10	Homéostatique
CCL28	MEC	CCR10	Inflamm., Homéo.

Adapté de Borish LC. *et al.*, 2003 et de Ono SJ. *et al.*, 2003

#### 4.1 Rôles physiologiques

Les chimiokines sont impliquées tant dans le développement et l'homéostasie du système immunitaire que dans le contrôle des réponses inflammatoires mobilisées pour défendre l'organisme contre les pathogènes et pour la réparation de tissus endommagés. Selon le rôle qu'elles accomplissent, il est possible de distinguer les chimiokines possédant une fonction de maintenance du système immunitaire des chimiokines à fonction pro-inflammatoire (Baggiolini M., 1998; Moser B. *et al.* 2001). Bien qu'il n'y ait pas de barrière stricte entre ces deux groupes, les gènes des chimiokines de maintenance sont généralement exprimés de manière constitutive et sont souvent essentiels pour l'organisme, tandis que les gènes de chimiokines pro-inflammatoires montrent une grande redondance et leur expression est inductible.

##### 4.1.2 Les chimiokines de maintenance ou homéostatiques

Les chimiokines homéostatiques sont responsables de la distribution spécifique des différentes populations de leucocytes dans les organes lymphoïdes. Des chimiokines



exprimées de manière constitutive fournissent un signal permanent pour l'attraction de cellules dendritiques et de lymphocytes T et B immatures (Rossi D. *et al.*, 2000; Ansel KM. *et al.*, 2001; Ma, Q. *et al.*, 1998; Moser B. *et al.* 2001; Luther SA. *et al.*, 2001)

L'angiogénèse est un processus biologique étroitement contrôlé lors du renouvellement des vaisseaux et de leur réparation, mais qui peut également se trouver associé à des maladies inflammatoires ainsi qu'à la croissance de tumeurs. Les chimiokines CXC exercent un contrôle sur l'angiogénèse par un équilibre entre les chimiokines CXC-ELR, qui sont de puissants facteurs angiogéniques produisant leurs effets par le chimiotactisme des cellules endothéliales, et les chimiokines CXC-non-ELR qui ont des propriétés angiostatiques (Belperio JA. *et al.* 2000; Strieter RM. *et al.*, 1995)

#### **4.1.3 Les chimiokines inflammatoires**

Lors des infections microbiennes, les chimiokines sont responsables du recrutement par chimiotactisme des cellules immunes comprenant les granulocytes, les lymphocytes T et B, les cellules NK (Natural Killers), les monocytes et les cellules dendritiques (Rollins BJ., 1997; Rossi D. *et al.*, 2000). De nombreuses cellules, telles que les cellules endothéliales, les fibroblastes ou encore les macrophages, sécrètent les chimiokines pro-inflammatoires après activation par des cytokines ou par des stimuli d'origine microbienne. La direction du mouvement leucocytaire est déterminée par un gradient de chimiokines qui s'étend jusqu'aux vaisseaux sanguins. Les chimiokines possèdent des sites de liaison pour les groupements GAG (glycoaminoglycane) des protéoglycanes qui forment une couche à la surface des cellules. (Hoogewerf AJ. *et al.*, 1997; Koopmann W. *et al.*, 1997; Kuschert GS., 1997) Il semblerait qu'en s'accrochant aux groupements

GAG contenus sur la matrice extracellulaire de l'endothélium, les chimiokines créent une piste qui est suivie par les leucocytes. (Ali S. *et al.*, 2001; Kuschert GS. *et al.*, 1999; Middleton J. *et al.*, 2002)

La chimiokine inflammatoire prototype, l'IL-8, un membre des CXC chimiokines, est l'un des plus puissants agents chimioattractants pour les neutrophiles. (Peveri *et al.*, 1988) L'IL-8 peut être sécrétée suite à une stimulation avec des agents comme le LPS, le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  par les monocytes, les neutrophiles, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules épithéliales pulmonaires et par les lymphocytes T activés. (Yoshimura T. *et al.*, 1987; Schröder JM. *et al.*, 1988; Bazzoni F. *et al.*, 1991; Gimbrone MA. *et al.*, 1989; Strieter RM. *et al.*, 1989; Standiford TJ. *et al.*, 1990)

#### **4.2 Les récepteurs de chimiokines**

Les chimiokines agissent toutes par des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Il s'agit du groupe de récepteurs cellulaires le plus répandu et le plus large dans le génome des mammifères. Ces récepteurs possèdent une structure générale commune comportant une extrémité NH<sub>2</sub>-terminale extracellulaire, suivie d'un serpentin formé de sept domaines transmembranaires reliés par des boucles intracellulaires et extracellulaires, et se termine par une extrémité COOH-terminale cytoplasmique. (Strader CD. *et al.*, 1994) La région NH<sub>2</sub>-terminale est acide et participe à la reconnaissance du ligand. Les boucles extracellulaires sont aussi des domaines impliqués dans la liaison du ligand. (Baggiolini M. *et al.*, 1997) Les trois boucles intracellulaires fournissent les surfaces pour le couplage aux molécules effectrices responsables de la transduction du signal.

Les récepteurs de chimiokines sont bien moins nombreux que leurs ligands. Bien qu'un récepteur puisse lier plus d'une chimiokine, leurs ligands se restreignent toujours à une classe de chimiokines. Leur classification est donc basée sur celle des chimiokines et ils se subdivisent en 5 récepteurs CXC, 9 récepteurs CC, un récepteur C et un récepteur CX3C. Cette classification correspond également aux similarités de séquence entre récepteurs et au regroupement des gènes sur les chromosomes. (Baggiolini M. *et al.*, 1997; D'Ambrosio D. *et al.*, 2003) Les récepteurs de chimiokines sont exprimés principalement sur les leucocytes, mais également sur des cellules endothéliales, épithéliales, gliales et neuronales. Les cascades de signalisation intracellulaire déclenchées par l'activation des récepteurs des chimiokines aboutissent à une variété de réponses cellulaires : le réarrangement du cytosquelette, le chimiotactisme, l'activation de la transcription, la prolifération, la relâche de superoxydes et la dégranulation (Baggiolini M., 1998; Mackay CR., 2001). La stimulation par les chimiokines provoque, dans les secondes qui suivent la liaison, un changement radical et immédiat dans la forme de la cellule. Des réarrangements du cytosquelette sont à la base de ces transformations. La polymérisation et la dissociation simultanée des filaments d'actine mènent à la formation d'extrusions du cytoplasme, désignées lamellipodes, qui servent d'appuis à la cellule pour son déplacement (Baggiolini M., 1998).

## 5. Régulation transcriptionnelle des chimiokines inflammatoires

L'expression contrôlée des gènes des cytokines et des chimiokines est une composante essentielle de la réponse immune. La nature des cytokines et des chimiokines produites, aussi bien que le temps et le lieu de leur production, sont des facteurs très importants dans l'établissement d'une réponse immune appropriée face à un agent infectieux. L'expression aberrante de ces médiateurs est souvent associée à des conditions pathologiques, telles l'auto-immunité, l'atopie et l'inflammation chronique. (Szekanecz Z., *et al.*, 2003; Renauld JC. *et al.*, 2001; Godessart N. *et al.*, 2001; Scapini P. *et al.* 2000; Cassatella MA., 1999)

Dans le contexte de l'immunité innée et de l'inflammation, la reconnaissance des agents pathogènes et des stimuli inflammatoires est un prélude à l'induction génique des cytokines et des chimiokines. Comme nous le verrons plus loin, les bactéries opsonisées sont reconnues par des récepteurs spécifiques présents à la surface des phagocytes (neutrophiles et macrophages) ou inductibles suite à l'infection. Cependant, les endotoxines ou particules bactériennes libérées suite à une infection sont plutôt reconnues par des récepteurs spécifiques exprimés sur diverses populations cellulaires (Récepteurs de type Toll-like et récepteur du fMLP). (Janeway Jr. CA. *et al.*, 2002) Lors de l'inflammation, plusieurs autres molécules pro-inflammatoires sont rapidement libérées, notamment des cytokines, des médiateurs lipidiques et hormonaux, tous agissant également sur les cellules via des récepteurs spécifiques. Ces récepteurs reconnaissant les dérivés bactériens, les bactéries elles-mêmes ou les médiateurs inflammatoires participent à l'induction des cytokines et des chimiokines via l'activation de sentiers de signalisation spécifiques.

Même si l'expression génique implique plusieurs niveau de régulation (la transcription, l'épissage des ARNm, la stabilité des ARNm et la traduction), la transcription représente un déterminant essentiel et représente généralement l'étape la plus importante dans cette régulation. (Escoubet Lozach L. *et al.*, 2002) La transcription génique des cytokines et des chimiokines inductibles implique en plus des récepteurs, la participation concertée de diverses protéines cellulaires : des kinases, des phosphatases, des co-activateurs et des répresseurs transcriptionnels, des histone acétylases et déacétylases, des facteurs de transcription généraux et inductibles et bien entendu, l'ARN polymérase II. (Brivanlou AH. *et al.* 2002)

Les facteurs de transcription spécifiques inductibles sont très importants pour médier l'action des signaux (stimuli) reçus par la cellule puisqu'ils favorisent le recrutement de facteurs (co-activateurs et co-répresseurs) participant au remodelage de la chromatine qui, à leur tour faciliteront, l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle (facteurs de transcription de base et ARN polymérase II) aux promoteurs géniques. (Courey AJ. *et al.*, 2001; Torchia J. *et al.*, 1998) Cet ensemble de protéines avec la participation de protéines architecturales et les séquences activatrices spécifiques sur l'ADN forment un complexe nommé enhanceosome. (Merika M. *et al.*, 2001)

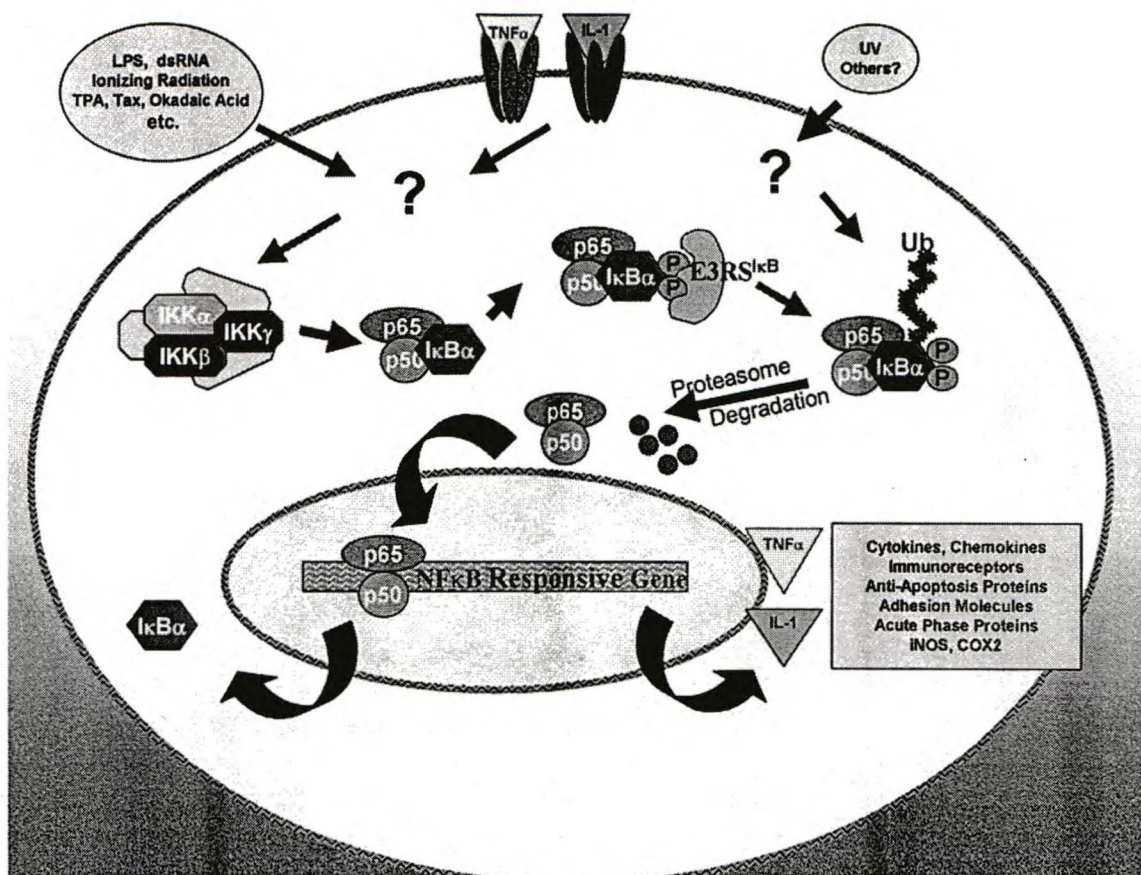
En ce qui concerne l'expression inductible des cytokines et des chimiokines, les facteurs de transcription spécifiques NFκB, AP-1, STAT et C/EBP sont connus pour participer à la formation de l'enhanceosome. (Holloway AF. *et al.*, 2002) Dans les prochaines sections, les facteurs de transcription NFκB, AP-1 et C/EBP et leurs mécanismes d'activation seront présentés dans le contexte de l'expression des cytokines et des chimiokines.

### 5.1 Le facteur transcriptionnel NFκB

Le facteur nucléaire kappa B (NFκB) a été originellement identifié comme une molécule régulatrice clé dans l'activation de la transcription génique chez le lymphocyte B. (Beg AA. *et al.*, 1994) Il est maintenant clair que son expression est ubiquitaire et qu'il est impliqué dans l'activation de gènes associés au système immunitaire et à l'inflammation, de même qu'à de nombreux autres processus physiologiques. (Bauerle PA. *et al.* 1996; Beg AA. *et al.*, 1996) Il est impliqué dans l'induction génique de plusieurs cytokines et chimiokines. Le facteur NFκB appartient à une famille de facteurs de transcription hautement conservée au fil de l'évolution, dont les membres possèdent un domaine d'homologie Rel. (Maniatis T., 1999) Cette famille inclut c-Rel, RelA, RelB et les protéines NFκB1 et NFκB2 dont les formes matures sont désignées p50 et p52. La forme prédominante de NFκB existante dans les cellules de mammifères se lie à l'ADN en tant que complexe hétérodimérique formé des protéines p50 et p65/RelA. (Urban MB. *et al.*, 1991; Baeuerle PA. *et al.* 1997) La sous-unité p65 est la composante transcriptionnellement active de ce complexe nécessaire pour la transcription génique. (Schmitz ML. *et al.*, 1991) À l'opposé des facteurs transcriptionnels qui résident dans le noyau de la cellule, le complexe NFκB est séquestré dans le cytoplasme par les protéines IκB sous une forme inactive. (Urban MB. *et al.*, 1990; Bauerle PA. *et al.*, 1988) Dans des conditions normales, l'interaction de NFκB avec IκB prévient sa translocation au noyau. (Bauerle PA. *et al.*, 198; Zabel U. *et al.*, 1993) L'activité NFκB peut être induite par de nombreux stimuli incluant diverses cytokines, notamment l'interleukine-1β et le TNF-α, mais aussi des dérivés bactériens comme le LPS et le fMLP, de même que

plusieurs autres agonistes. (Ghosh S. *et al.*, 1998; Messer G. *et al.*, 1990; Miyamoto S. *et al.*, 1997; Leonardo MJ. *et al.*, 1989) Récemment, une fonction anti-apoptotique a été attribué au facteur NFκB. (Barkett M. *et al.*, 1999; Karin M. *et al.*, 2002) Les mécanismes exacts par lesquels les stimuli activent NFκB sont de mieux en mieux compris, mais certaines facettes de son activation restent à définir davantage (résumé dans la figure 3). On sait que son activation requiert la phosphorylation et la dégradation d'IκB-α. (Miyamoto S *et al.*, 1997; Leonardo MJ. *et al.*, 1989) Cette phosphorylation est médiée par les IKK (IkappaB-α kinase), principalement IKKα et IKKβ. (Zandi E., *et al.*, 1997) La dégradation inductible de IκB-α permet au complexe NFκB de transloquer au noyau et d'affecter la transcription. (Beg AA. *et al.*, 1994; Zabel U. *et al.*, 1993; Henkel T. *et al.*, 1993) Le domaine N-terminal d'IκB-α représente un site important de régulation: lorsque les sérines en positions 32 et 36 d' IκB-α sont phosphorylées, cela promeut l'ubiquitination d'IκB-α, suivie de sa dégradation par le protéasome 26S. (Sun SC. *et al.*, 1993; Karin M, *et al.*, 2000)

Les gènes du TNF-α, de l'IL-1α/β, de l'IL-1ra, de l'IL-12, de l'IL-8, de Groα, de MIP-1β, d'IP-10 et de MIP-3α sont des exemples de cytokines et de chimiokines sous le contrôle de NFκB. (Pahl HL., 1999; Sugita S. *et al.*, 2002)



**Figure 3. Mécanismes d'activation du NFκB.**

Plusieurs stimuli, incluant les cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IL-1, activent les IKK via l'action de composantes plus ou moins connues. Une fois activé, IKK phosphoryle IκB, menant à sa reconnaissance par E3RS<sup>IκB</sup>, laquelle effectue la polyubiquitination d'IκB. Cela cible IκB pour une dégradation rapide par le protéasome 26S. La dégradation d'IκB permet l'exposition de la séquence de localisation nucléaire du NF-κB résultant en sa translocation dans le noyau. Dans le noyau, NF-κB régule la transcription de gènes-cibles, incluant IκB, lequel termine l'activité NF-κB. Quelques gènes-cibles de NF-κB codent pour des médiateurs inflammatoires, tels que le TNFα et IL-1 et bien sûr des chimiokines, lesquelles mènent au recrutement de cellules additionnelles afin de poursuivre la réponse inflammatoire. Extraite de Karin M. *et al.*, 2000.



## 5.2 Le facteur transcriptionnel AP-1

Les proto-oncogènes de la famille Fos et de la famille Jun codent pour des protéines qui sont les constituants du complexe AP-1. Celui-ci peut être constitué de plusieurs types de protéines apparentées qui sont c-Fos, FosB, Fra1, Fra2 et c-Jun, JunB et JunD. (Chinenov Y. *et al.*, 2001) Ces facteurs de transcription homodimérisent (famille Jun) ou hétérodimérisent (familles Jun et Fos) via des motifs "fermeture éclair à Leucine" (bZIP), que l'on retrouve aussi chez les facteurs de transcription CREB/ATF. Les protéines Jun peuvent également dimériser avec les protéines ATF, mais aucune évidence n'a été démontré dans le cas de CREB. (Chinenov Y. *et al.*, 2001) Les dimères Jun-Jun et Jun-Fos se lient préférentiellement à des éléments de réponse aux esters de phorbol (TPA ou PMA) dont la séquence consensus est TGACTCA, alors que les dimères Jun-ATF ou ATF-ATF se lient aux éléments de réponse à l'AMPc (CRE). (Lee W. *et al.*, 1987; Kerppola TK. *et al.*, 1993) Le taux d'expression des protéines Jun et apparentées est généralement plus élevé que celui de Fos, aboutissant à la formation privilégiée d'homodimères Jun/Jun. (Karin M. *et al.*, 1997) L'expression génique de plusieurs cytokines et chimiokines est sous le contrôle partiel du facteur de transcription AP-1, des exemples sont l'IL-8, IL-1 $\beta$ , l'IL-1ra, le TNF- $\alpha$ , MCP-1, l'IL-6, le GM-CSF et RANTES. (Yasumoto K. *et al.*, 1992; Smith MF. *et al.*, 1992; Hurme M. *et al.*, 1993; Sung SJ. *et al.*, 1991) L'activité des complexes AP-1 est modulée par phosphorylation : c-Jun est phosphorylé par une sous-classe de MAPK kinases appelée les « Jun N-terminal kinases » (JNK). (Hibi M. *et al.*, 1993) Divers stimuli sont capables de les activer comme les U.V., les radiations ionisantes, le LPS et les cytokines inflammatoires (IL-1 $\alpha$ , IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ). (Hibi M. *et al.*, 1993; Westwick JK. *et al.*, 1994; Guan Z. *et al.*, 1996;

Raingaud J. *et al.*, 1995) La phosphorylation de Jun accroît son activité transcriptionnelle. La phosphorylation de c-Jun par JNK accroît fortement son affinité pour CBP et vraisemblablement pour son homologue p300. Cette interaction aboutit à une stimulation de la transcription par AP-1. (Bannister AJ. *et al.*, 1995) Finalement, Jun est capable de stimuler la synthèse de son propre gène via des éléments de réponse au TPA, essentiellement via ATF, qui est phosphorylé par JNK. (Angel P. *et al.*, 1988) La protéine Fos est, quant à elle, phosphorylée et activée spécifiquement par la « Fyn-related-kinase » (FRK). (Deng T., *et al.*, 1994) Il est à noter que la MAPK ERK et la RSK (ribosomal S6 kinase), suite à une stimulation par des agents mitogènes, peuvent activer directement c-Fos. (Murphy LO. *et al.*, 2002)

En conclusion, l'augmentation de l'activité des complexes AP-1 se produit par deux phénomènes : une augmentation rapide de la synthèse de leur gène, et la phosphorylation des deux composantes de l'hétérodimère par des kinases spécifiques. (Liebermann DA. *et al.*, 1998). De plus, un troisième mode de régulation a été décrit : il s'agit de l'ubiquitination, qui agit sur le « turn-over » de c-Jun et favorise sa dégradation via le protéasome 26S (Ciechanover A. *et al.*, 1998). Ce ciblage affecterait préférentiellement la forme non- phosphorylée par JNK (Karin et al., 1997; Fuchs SY. *et al.*, 1997; Musti AM. *et al.*, 1997)

### 5.3 Les facteurs de transcription C/EBP

Le premier membre de la famille C/EBP, la protéine C/EBP- $\alpha$ , a été identifiée comme un facteur stable à la chaleur dans le noyau d'hépatocytes chez le rat. (Landschulz WH., *et al.*, 1988) Des études détaillées sur cette protéine ont d'ailleurs permis la découverte du motif basique à fermeture-éclair (bZIP), lequel est maintenant connu pour être présent dans le domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN de nombreux autres facteurs de transcription. (Landschulz WH. *et al.*, 1989 )

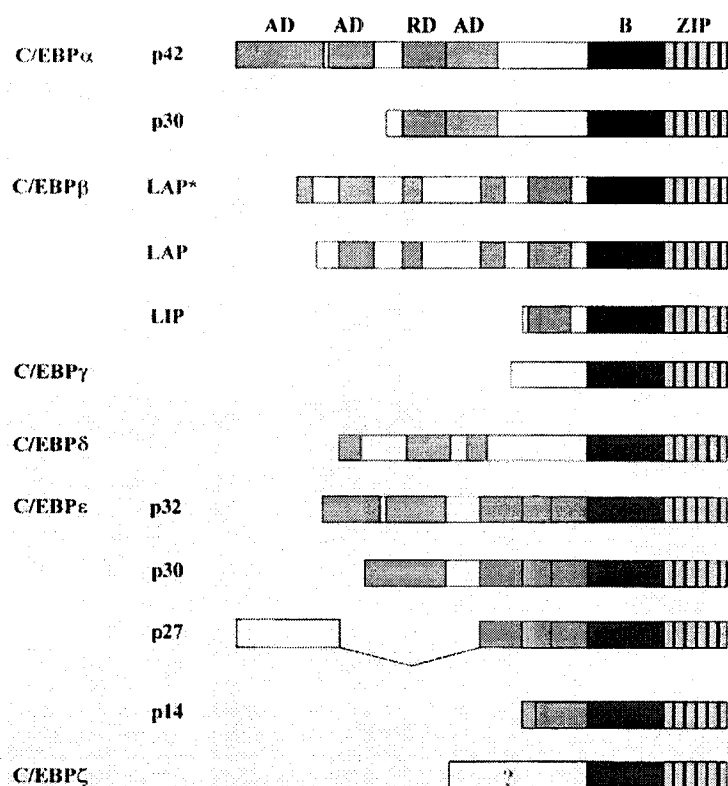
Depuis la découverte du premier membre de la famille C/EBP, cinq autres membres se sont ajoutés. Ayant été découverte dans différents laboratoires et nommée de façon distincte, Cao et ses collaborateurs ont proposé une nomenclature systématique basée sur l'ordre chronologique de leur découverte, soit C/EBP- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  et  $\zeta$ . Les membres de la famille C/EBP sont connus pour leur rôle très important dans de nombreux processus physiologiques, incluant la différenciation et la prolifération de nombreux types cellulaires, le métabolisme énergétique, et l'inflammation. (Hanson RW., 1998; Poli V, 1998; Ramji DP. *et al.*, 2002) En ce qui concerne plus spécifiquement l'inflammation, les C/EBP ont été décrits pour participer à l'induction de plusieurs gènes tels que le G-CSF, le récepteur du G-CSF, le récepteur du GM-CSF, l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 p40, l'iNOS, MCP-1, le récepteur du M-CSF et MIP-1 $\alpha$ . (Ramji DP. *et al.*, 2002) Les protéines C/EBP se lient à la séquence consensus ATTGCGCAAT sur les promoteurs géniques et à certaines variantes dépendant de la nature de l'hétérodimère formé.

Malgré l'existence de six gènes, le nombre de protéines C/EBP peut être considérablement plus grand. Premièrement, différents polypeptides de tailles différentes

peuvent être produits pour C/EBP- $\alpha$  et C/EBP- $\beta$ , soit par un usage alternatif de codons d'initiation de la traduction dans un même ARNm, soit par protéolyse régulée. (Descombes P. *et al.*, 1991; Ossipow V. *et al.*, 1993; Lin FT. *et al.*, 1993; Welm AL. *et al.*, 1999) Ainsi, l'ARNm de C/EBP- $\alpha$  peut générer deux polypeptides, un de 42kDa et un de 30kDa, la plus petite forme ayant un potentiel transcriptionnel plus faible.

( Ossipow V. *et al.*, 1993; Lin FT. *et al.*, 1993) L'ARNm de C/EBP- $\beta$  peut produire au moins trois isoformes, une de 38kDa, une de 35kDa (LAP) et une de 20kDa (LIP). Les deux premières formes contiennent les domaines d'activation et le domaine bZIP, tandis que la plus courte ne possède que le domaine bZIP, et agit par conséquent comme un inhibiteur des fonctions des C/EBP en formant des hétérodimères non fonctionnels avec les autres membres. (Descombes P. *et al.*, 1991) Pour ce qui est de C/EBP- $\epsilon$ , l'utilisation alternative de promoteur et l'épissage alternatif génèrent 4 isoformes (32kDa, 30kDa, 27kDa et 14kDa). Le potentiel d'activation de la forme de 30kDa est plus faible que celle de 32 kDa, et à la forme de 14kDa manque un domaine intact d'activation transcriptionnel. ( Yamanaka R. *et al.*, 1997, Lekstrom-Himes JA., 2001).

Les différents C/EBP sont capables de former des hétérodimères dans toutes les combinaisons. (Ramji DP. *et al.*, 2002) Étant donné les différents potentiels de transactivation génique de chaque membre, la nature de l'hétérodimérisation a sûrement un impact sur la régulation des gènes cibles. (Poli V. *et al.*, 1990; Kinoshita S. *et al.*, 1992; Williams SC. *et al.*, 1995; Ramji DP. *et al.*, 1993) Les C/EBP peuvent de plus former des interactions avec d'autres facteurs de transcription ayant ou non un bZIP tel que NF $\kappa$ B et AP-1. (LeClair, KP. *et al.*, 1992; Stein B. *et al.*, 1993; Vallejo M. *et al.*, 1993; Hsu W. *et al.*, 1994)



**Figure 4. Représentation schématique des membres de la famille C/EBP**

Le motif "leucine zipper" est ici présenté en jaune, les lignes noires représentent les résidus leucines dans ce motif. Le domaine de liaison à l'ADN basique est montré en rouge. La position des domaines d'activation (AD) et des domaines de régulation négatives (RD) sont représentés en vert et bleu, respectivement. Le point d'interrogation indique que la région N-terminale de C/EBPζ contient un domaine d'activation, même si la position exacte de celui-ci reste à être déterminée. Extraite de Ramji DP. *et al.*, 2002

Les C/EBP sont contrôlés à plusieurs niveaux (résumé dans le tableau 2). Leur régulation s'effectue par des changements au niveau de l'expression, de leur localisation, de leur phosphorylation et de leur capacité à lier l'ADN. Tout dépendant du type cellulaire, l'expression des différents C/EBP peut être constitutive ou inducible. Chez la lignée de macrophages RAW 264, par exemple, l'expression de l'ARNm des C/EBP-β et C/EBPδ peut être induite par le LPS, de même que leurs translocations nucléaires. (Cho Y. *et al.*, 2003) La translocation nucléaire rapide des C/EBP-β et C/EBPδ (5-30 min) a

aussi été observée chez des hépatocytes suite à une stimulation au TNF- $\alpha$ . (Yin M. *et al.*, 1996) Consistant avec cette redistribution nucléaire, une augmentation de la liaison à l'ADN par ces deux isoformes a aussi été observée. L'expression de l'ARNm et la localisation nucléaire de C/EBP- $\alpha$ , par contre, sont drastiquement diminués suite à la stimulation au TNF- $\alpha$ . Une autre étude a cependant démontré que le TNF- $\alpha$  induisait une diminution de la liaison des C/EBP- $\alpha$  et C/EBP- $\beta$  à l'ADN, de même que la diminution de la quantité nucléaire de C/EBP- $\alpha$ . (Jain R. *et al.*, 1999) La phosphorylation des C/EBP dans une région de régulation négative a aussi été démontrée comme importante pour leur activation. (Williams SC. *et al.*, 1995; Kowenz-Leutz E. *et al.*, 1994) L'isoforme C/EBP- $\beta$  a été démontré comme étant la cible des kinases PKC, de la kinase PKA, des ERKs et de la protéine kinase dépendante de la voie calcium-calmoduline. (Zhu S. *et al.* 2002; Wegner M. *et al.*, 1992; Nakajima T. *et al.*, 1993; Trautwein C. *et al.*, 1993; Hu J. *et al.*, 2001)

**Tableau 2. Régulation des C/EBP (Adapté de Ramji DP. *et al.* 2002)**

Gènes	Niveau	Activateurs	Répresseurs
C/EBP- $\alpha$	ARNm  Liaison à l'ADN	Hormone thyroïdienne, thiazolinediones	EGF, glucocorticoïde, hormone de croissance, IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, LPS, TNF- $\alpha$ , insuline EGF, activateurs de la PKC
C/EBP- $\beta$	ARNm  NL  Phosphorylation  Liaison à l'ADN	AMPc, IL-1, IFN- $\gamma$ , LPS hormone de croissance  cAMP, LPS, TNF- $\alpha$ , TPA  Ca <sup>2+</sup> , IL-6, activateurs des MAPK, activateurs des PKC TGF- $\beta$ , LPS, TNF- $\alpha$ , EGF, IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$  Insuline
C/EBP- $\delta$	ARNm  NL	IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, LPS, TNF- $\alpha$ , AMPc  APMc, TNF- $\alpha$	
C/EBP- $\epsilon$  C/EBP- $\zeta$	ARNm ARNm  Phosphorylation	acide rétinoïque stress du RE, stress oxydatif, NO, LPS UV, PGA2, Ca <sup>2+</sup> stress cellulaire	

## 6. Les neutrophiles

Les neutrophiles polymorphonucléaires constituent la plus grande population leucocytaire dans le sang. Ils représentent en effet de 60 à 70% des globules blancs. Les neutrophiles ont une très courte existence, leur demi-vie dans le sang périphérique ne dépassant pas normalement 6 à 12 heures. Ils meurent par apoptose spontanée de façon constitutive. (Akgul C. *et al.*, 2001) Cette facette particulière aux neutrophiles a d'ailleurs incité plusieurs laboratoires à utiliser les neutrophiles comme modèle de leur étude sur l'apoptose. Ils sont constamment générés à partir de progéniteurs myéloïdes de la moëlle osseuse afin de contrebalancer leur élimination constitutive. (Dancey JT. *et al.*, 1976) On estime qu'il y a environ  $10^{11}$  neutrophiles produits chaque jour. Lors d'infection, les neutrophiles sont relâchés en plus grand nombre par la moëlle osseuse et quelquefois avant leur pleine maturation. (Bainton DT, 1992) Les neutrophiles, lorsqu'ils sont activés, peuvent cependant survivre jusqu'à 48 heures et contribuent donc directement à l'inflammation grâce à leur production de diverses molécules inflammatoires. Afin de prévenir la libération de leur contenu hautement toxique, leur élimination par apoptose est d'autant plus nécessaire pour la résolution de l'inflammation. Cette élimination est effectuée par exemple par les macrophages suite à la reconnaissance de molécules spécifiques à leur surface, dont la phosphatidylsérine. (Fadok VA. *et al.*, 2000) La phagocytose des neutrophiles par les macrophages induit chez ces derniers la génération de molécules anti-inflammatoires tels le TGF- $\beta$  et la PGE<sub>2</sub>, un autre élément non-négligeable du retour à des conditions physiologiques normales. (McDonald PP. *et al.*, 1999; Fadok VA. *et al.*, 1998) Reconnus pour leurs rôles majeurs dans les réponses inflammatoires et dans l'immunité innée, les neutrophiles



font figure de première ligne du système de défense de l'organisme, des fantassins que l'on envoie sur la brèche afin de maintenir l'homéostasie corporelle. Ils jouent d'ailleurs un rôle prépondérant dans la défense anti-microbienne.

### 6.1 Les neutrophiles : fonctions classiques

Les premières études sur les neutrophiles ont porté sur leur rôle dans la défense anti-microbienne, notamment la phagocytose et la libération de molécules bactéricides. Dans cette section, je décris brièvement les fonctions classiques des neutrophiles, pour plus de détails, je vous suggère le chapitre sur la phagocytose dans le livre « Fundamental Immunology » de Paul WE.

La phagocytose des particules étrangères ou de matériels endommagés est un élément-clé du processus inflammatoire. (Allen LA. *et al.*, 1996) La phagocytose par les neutrophiles implique deux classes de récepteurs différents, soit les récepteurs reconnaissant la partie Fc des immunoglobulines et les récepteurs des protéines clivées du complément. (Aderem A. *et al.*, 1999) L'ingestion des microorganismes ou particules opsonisées par les anticorps est médiée par la première classe (les récepteur Fc). Les protéines du complément dans le sérum peuvent aussi opsoniser les microbes par des mécanismes dépendant et indépendant des anticorps. Les particules osponisées avec le complément sont reconnues et internalisées via des récepteurs spécifiques du complément (principalement CR1 et CR3 chez les neutrophiles). La coopération entre les récepteurs Fc et les récepteurs du complément se produit lorsque des microorganismes sont opsonisés simultanément par les deux types de molécules. Ainsi, la ligation de récepteur du complément 1 (CR1) et du (CR3) augmente la phagocytose médiée par les récepteurs Fc. (Brown EJ, *et al.*, 1988, Ghiran I. *et al.*, 2000) Suite à la capture des

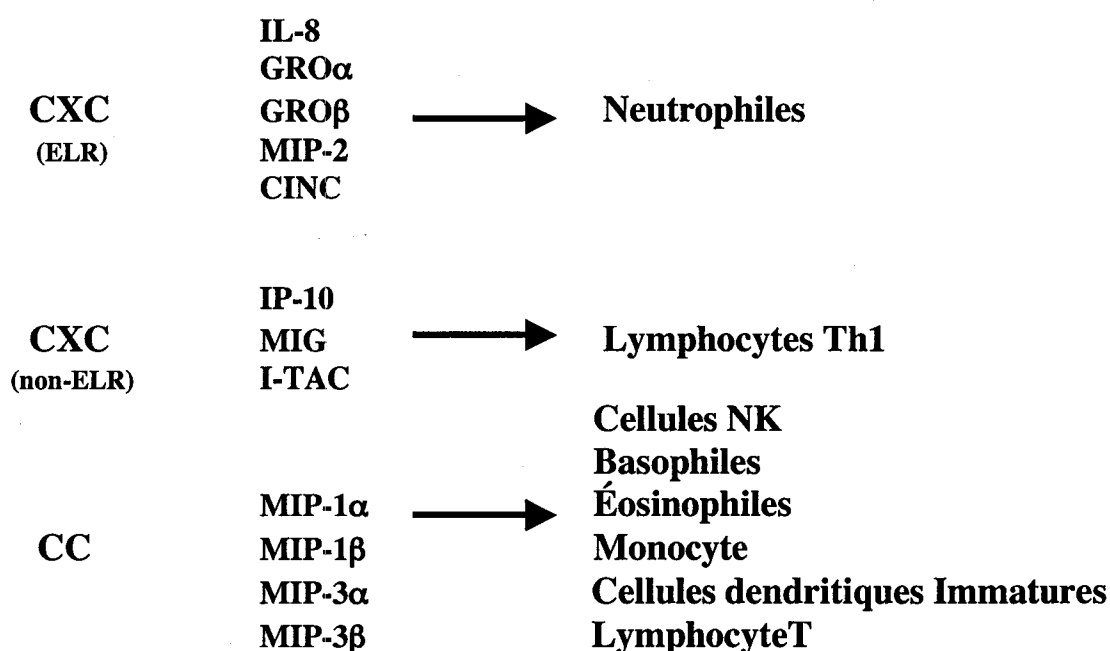
microorganismes enveloppés par les opsonines, il y a internalisation de ceux-ci pour former un phagosome; les granules cytosoliques fusionnent alors avec le phagosome dans lequel elles déversent leur contenu formant ainsi le phagolysosome. Ceci crée un micro-environnement hautement toxique permettant la destruction des microorganismes. Lorsque le microorganisme est trop gros pour être phagocyté, la libération extracellulaire de dérivés oxygénés et du contenu granulaire se produit. Cette dégranulation peut se produire également lors de différentes stimulations. (Witko-Sarsat V. *et al.*, 2000). Les granules des neutrophiles contiennent diverses protéines ayant des propriétés antimicrobiennes (Élastase, Lysozyme, Cathepsin G, Défensines, etc...) et représentent un puissant arsenal contre les infections. De plus, lorsque les neutrophiles sont activés, ils peuvent produire des anions superoxydes ( $O_2^-$ ) via l'action de la NADPH oxydase à partir de l'oxygène et des électrons libres. Ces anions superoxyde sont convertis en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par la superoxyde dismutase ou en acide hypochlorique par la myéloperoxydase. De plus, l'oxyde nitrique produit par les synthétase de l'oxyde nitrique peut interagir avec l'anion superoxyde pour former la peroxinitrite, un autre produit hautement toxique. Par le biais de l'explosion respiratoire (NADPH oxydase), de la dégranulation et de la phagocytose, les neutrophiles sont donc prêts pour lutter contre toute invasion antixénique.

## 6.2 Génération de cytokines et chimiokines par les neutrophiles

Au cours de la dernière décennie, il est devenu évident que les fonctions des neutrophiles ne se restreignent pas à la phagocytose, la dégranulation et à la génération de dérivés oxygénés. Les premières investigations quant à la capacité d'induction génique chez les neutrophiles matures n'étaient pas très concluantes. On croyait alors que les protéines des neutrophiles étaient synthétisées et entreposées uniquement durant le processus de maturation dans la moëlle osseuse. (Berliner N. *et al.*, 1998) Plusieurs aspects caractéristiques des neutrophiles pointaient dans cette direction. Premièrement, leur courte durée de vie ne laisse pas présager la possibilité de néo-synthèse d'ARN messagers et de protéines. De plus, la faible quantité d'ARNm présente chez les neutrophiles, de même que la rareté des constituants traductionnels (ribosomes et réticulum endoplasmique), renforçait cette idée. (Newburger PE. *et al.*, 2000) Un autre aspect important qui a fortement affecté ces études chez les neutrophiles est la présence massive de protéases et de nucléases endogènes. (Borregaard N. *et al.*, 1996) D'ailleurs, quelques études n'ont pu détecter la présence de certains facteurs transcriptionnels (NFκB et Stat) chez les neutrophiles, à cause de la dégradation générée lors du processus d'isolation protéique. (Browning DD. *et al.*, 1997; Tweardy DJ. *et al.*, 1995) Enfin, dans ces mêmes études, les auteurs ont d'ailleurs proposé la présence de nouvelles formes tronquées de facteurs transcriptionnels. Nous avons toutefois prouvé que c'était vraisemblablement la résultante de la protéolyse. (McDonald PP. *et al.*, 1998 et Cloutier A. *et al.*, 2003). L'usage méthodique d'inhibiteurs de protéases et l'utilisation de nouvelles techniques de lyse ont permis de remédier à ce problème.

Récemment, il y a eu une incroyable expansion dans le domaine de l'expression génique chez les neutrophiles. Le répertoire d'ARNm et de protéines exprimées chez les neutrophiles matures a considérablement augmenté, notamment en ce qui concerne la production de cytokines et des chimiokines. Actuellement, les neutrophiles sont connus pour être capable de produire une vaste gamme de cytokines, incluant les facteurs de croissance et les chimiokines. Deux revues de littérature résument bien les cytokines et les chimiokines produites par les neutrophiles. (Scapini P. *et al.*, 2000; Cassatella MA., 1999) Dans la figure 5, une liste des chimiokines actuellement connues pour être produites par les neutrophiles humains est présentée. Les neutrophiles sécrètent des chimiokines de types CC et des CXC. L'IL-8 est la chimiokine caractéristique produite par les neutrophiles. Les premières études sur l'IL-8 ont surtout caractérisé son effet chimioattractant envers les neutrophiles. Toutefois, elle peut être aussi produite en quantité considérable par les neutrophiles suite à l'exposition de ceux-ci à divers stimuli tels que le LPS, le TNF- $\alpha$ , le fMLP, IL-1 $\beta$ , le C5a, les bactéries opsonisées et plusieurs autres (résumé dans Cassatella MA., 1999). Les neutrophiles peuvent sécréter d'autres chimiokines ayant une sélectivité dans l'attraction leucocytaire (voir la figure 5). Puisque les neutrophiles sont généralement les premières cellules recrutées au site inflammatoire, et ce en nombre considérable, ils pourraient à travers l'expression et la libération de chimiokines, orchestrer le recrutement sélectif d'autres populations leucocytaires au site inflammatoire. (Lloyd AR. *et al.*, 1992; Cassatella MA., 1995b) Les neutrophiles peuvent donc influencer directement la réponse inflammatoire et la mise sur pied d'une réponse immune spécifique à l'agent pathogène. (Lloyd AR. *et al.*, 1992; Cassatella MA., 1995b)

Grâce à la technique de détection de l'ARN messager par puces à ADN (« DNA Chip»), une quantité croissante d'études ont aussi révélé que les neutrophiles suite à diverses stimulations (bactéries opsonisées, LPS, G-CSF) étaient capables de moduler l'expression de quelques centaines de gènes participant entre autres à la reconnaissance bactérienne (récepteurs phagocytaires et TLRs), à la liaison de chimiokines (récepteurs CCR), et à l'apoptose. (Itoh K. *et al.*, 1998; Suzuki S. *et al.*, 2002; Tsukahara Y. *et al.*, 2003; Kobayashi SD. *et al.*, 2003; Kobayashi SD. *et al.*, 2003b; Kobayashi SD. *et al.*, 2002; Fessler MB. *et al.*, 2002)



**Figure 5. Cytokines et chimiokines produites par les neutrophiles humains et leurs cellules cibles.**

S'il y a de plus en plus de gènes connus pour être exprimés chez les neutrophiles, les mécanismes régissant leurs induction sont encore peu connus et font l'objet de recherche intensive dans plusieurs laboratoires incluant le nôtre. Plusieurs agonistes modulent les

gènes inflammatoires chez les neutrophiles au niveau de l'expression des messagers et des protéines. Ces changements dans l'expression génique chez les neutrophiles sont le reflet d'une modulation de l'activité transcriptionnelle. (Marucha, PT. *et al.*, 1991; Wang P. *et al.*, 1994; Cassatella MA. *et al.*, 1995; Casstella MA. *et al.*, 1996) Cependant, des événements post-transcriptionnels tel que une modification de la stabilité de l'ARNm ont aussi été démontrés pour prendre part à ce changement dans l'expression génique chez les neutrophiles. (Wang P. *et al.*, 1994; Page SM. *et al.*, 1999; Cassatella MA., *et al.*, 1995, Ethuin F. *et al.*, 2001)

Étant donné qu'une augmentation dans l'activité transcriptionnelle est directement liée à la participation d'activateurs et de co-activateurs transcriptionnels, notre groupe s'est intéressé tout particulièrement à l'étude des facteurs de transcription chez les neutrophiles.

En annexe, vous trouverez un chapitre de livre que j'ai co-écrit résumant les progrès faits dans l'élucidation des mécanismes transcriptionnels impliqués dans l'expression génique inductible chez les neutrophiles humains. L'accent est mis sur les facteurs de transcription déjà identifiés et partiellement caractérisés (NF $\kappa$ B et STAT) chez les neutrophiles, et ceux ayant une implication potentielle (AP-1, C/EBP, Ets).

**Objectifs de l'étude:**

- A) Déterminer l'expression des protéines AP-1 et C/EBP chez les neutrophiles humains non stimulés et activés avec divers stimuli.
- B) Déterminer s'il y a activation de ces facteurs de transcription suite à une stimulation, soit une translocation nucléaire ou une induction de la liaison à l'ADN.
- C) De façon ultime, déterminer l'impact des facteurs de transcription AP-1 et C/EBP dans la génération des cytokines et de chimiokines chez les neutrophiles humains.

## Matériel et Méthodes :

### Anticorps et réactifs

Des anticorps purifiés et dirigés contre les protéines des familles Jun, Fos et C/EBP ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) et chez Geneka (Montréal, Québec, Canada). Un oligonucléotide contenant des sites NF $\kappa$ B répétés en tandem identiques à ceux du promoteur du HIV a été synthétisé (5'-gatcaGGGACTTTCCgctgGGGACTTTCC-3') et un oligonucléotide contenant un site NFIL-6 (5'-ggacgtgacaTTGCACAATctt aa-3') nous a été généreusement donné par le Dr. Shizuo Akira. Un oligonucléotide contenant un site consensus AP-1 (5'-cgcttgaTGAGTCAgccggaa-3') et un oligonucléotide contenant un site consensus C/EBP (5'-tgcagaTTGCGCAAtctgca-3') ont été achetés chez Promega (Madison, WI) et chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), respectivement. Le Ficoll-Paque, la T4 polynucléotide kinase et le poly (acide déoxyinosique-acide déoxycytidylique) ont été achetés chez Pharmacia (Uppsala, Suède); L'[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP et 1' [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP ont été achetés chez NEN (Boston, MA). Le RPMI 1640 et le FCS sans endotoxines (<6pg/ml) ont été achetés chez BioMédia (Drummondville, Québec, Canada) et HyClone (Logan, UT), respectivement. Les cytokines recombinantes (TNF- $\alpha$ , GM-CSF) ont été achetées chez R&D Systems (Minneapolis, MN), et le LPS (*Escherichia coli* 0111 :B4) a été acheté chez List Biological Laboratories (Campbell, CA). L'acétyl-BSA, la cycloheximide, le diisopropyl fluorophosphate (DFP), le fMLP, le PMA et le PMSF ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Les inhibiteurs de protéases, aprotinine, 4-(2-aminométhyl)benzènesulfonyl fluoride, la leupeptine, et la pepstatin A provenaient de Boehringer-Mannheim (Mannheim, Allemagne). Les inhibiteurs de JNK (SP600125)



et du protéasome (MG-132 et MG-262) ont été achetés chez Calbiochem (San Diego, CA). Tous les autres réactifs étaient de la plus grande qualité disponible, et tous les tampons et solutions ont été préparés utilisant de l'eau sans pyrogène de qualité clinique.

### **Isolation et culture cellulaire**

La lignée promyélocytaire humaine PLB-985 a été achetée chez Deutsche Sammlung von mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Allemagne), et cultivée à 37°C sous une atmosphère de 5% CO<sub>2</sub> dans du RPMI 1640 supplémenté de 10% FCS inactivé à la chaleur (56°C, 30 min), de 2mM L-glutamine et des antibiotiques (100µg/ml streptomycine et 100U/ml pénicilline). Les neutrophiles ont été isolés du sang périphérique de donneurs sains sous des conditions aseptiques sans endotoxines selon la méthode de Boyum à l'exception que toute la procédure a été effectuée à température ambiante. (Boyum A., 1968) Brièvement, le sang a été prélevé par venipuncture et centrifugé à 200xg, 10min; le plasma a été enlevé et remplacé par du PBS stérile. Après la sédimentation au dextran, les cellules ont été centrifugées sur du Ficoll-Paque; l'anneau de PBMC a été soigneusement recueilli, et les érythrocytes contenu dans le culot granulocytaire ont été enlevés par lyse hypotonique avec de l'eau (20s). Les neutrophiles ont été resuspendus dans du RPMI 1640 supplémenté de 10% FCS et de L-glutamine, à une concentration finale de 5 X10<sup>6</sup> cellules/ml (à moins qu'autrement spécifié). Tel que déterminé par coloration Wright/Giemsa, la préparation de neutrophiles contenait moins de 0,5% de monocytes ou de lymphocytes. La viabilité des neutrophiles excédait 98% après trois heures en culture, déterminée par exclusion au bleu de trypan. Les cellules isolées ont été mises en culture dans des pétris (traités pour la culture cellulaire) à 37°C

sous un atmosphère de 5% CO<sub>2</sub>; dans quelques expériences, les cellules ont été cultivées dans des tubes de polypropylène à 37°C, avec une agitation occasionnelle. Lorsqu'indiqué, les neutrophiles ont été resuspendus à haute densité (20 x 10<sup>6</sup> cellules/ml) et ils ont été laissé sédimer pour 55min à 37°C, avant d'être resuspendus à 5 x 10<sup>6</sup> cellules/ml et mis en culture pour une stimulation; cela promeut l'adhérence cellulaire. Ces neutrophiles ainsi traités seront désormais référer comme des neutrophiles adhérents.

### **EMSAs (« Electrophoretic mobility shift assays »)**

Les cellules ont été incubées à 37°C en présence ou en absence de stimuli. Les incubations ont été arrêtées en ajoutant un volume équivalent de PBS froid contenant du DFP (2mM concentration finale) et des inhibiteurs de phosphatases (10mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), avant une centrifugation de 5 min à 300g. Les cellules ont été resuspendues dans le tampon de relaxation froid (10mM PIPES (pH 7.30), 10mM NaCl, 3,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5mM EGTA, 0,5mM EDTA et 1mM DTT) supplémenté d'inhibiteurs de protéases (1mM DFP, 1mM PMSF, 1mM 4-(2-aminométhyl)benzènesulfonyl fluoride, et 10µg/ml d'aprotinine, de leupeptine et de pepstatine A) en plus des inhibiteurs de phosphatases ci-haut mentionnés. Les extraits nucléaires ont ensuite été préparés en utilisant une procédure par cavitation à l'azote ( référer comme Bombe à azote), laquelle a été décrite précédemment. (McDonald PP. *et al.*, 1997; McDonald PP. *et al.*, 1998) Les extraits nucléaires ainsi obtenus ont été analysés par EMSA pour la liaison de NFκB tel que décrit dans McDonald PP. *et al.*, 1997, ainsi que pour la liaison de C/EBP. Pour les analyses EMSA de la liaison d'AP-1, un tampon de liaison différent a été utilisé (20mM

HEPES (pH 7.50), 50mM KCl, 0,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 5mM DTT, 0,1% Nonidet P-40, 6%glycérol, 20µg/ml poly (acide déoxyinosique déoxycytidylique) et 0.4mg/ml d'acétyl-BSA).

### **Électrophorèses et Immunobuvardages de type Western**

Pour les échantillons cellulaires totaux (« Whole cell samples »), les incubations ont été arrêtées tel que décrit plus haut; un petit aliquot de chaque échantillon a été pris pour une analyse subséquente du contenu protéique, et les neutrophiles ont été centrifugés pour 10 min à 200g. Du tampon d'échantillon bouillant a été ajouté directement sur le culot cellulaire, lequel a été vortexé brièvement et bouilli 3 min à 95 °C. Les échantillons ainsi préparés ont été soniqués pour défaire la chromatine et entreposés à -20°C avant l'analyse. Lorsque des fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été préparées, les neutrophiles ont été lysés par cavitation à l'azote. Cette procédure permet d'obtenir des fractions nucléaires et cytoplasmiques exemptes de contamination. (McDonald PP. *et al.*, 1997; McDonald PP. *et al.*, 1998) Après avoir déterminé la concentration protéique des extraits (Bradford), ceux-ci sont bouillis 3min en présence de tampon d'échantillon concentré préchauffé à 95°C pour obtenir une concentration finale de 1X i.e., 25mM Tris base (pH 6.80), 2% SDS, 5% 2-ME, et 10% glycérol. Tous les échantillons sont migrés par électrophorèse de type SDS-PAGE selon la méthode de Laemmli sur des gels de 10-12%. (Laemmli UK., 1970) Après les SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur des membranes de nitrocellulose, lesquelles sont colorées au rouge de Ponceau, décolorées, bloquées (avec du TBS avec du lait 5% ou du BSA

4%), puis analysées avec les différents anticorps tel que décrit dans McDonald PP. *et al.*, 1997.

### **Isolation de l'ARN et RPAs (« RNase Protection Assays »)**

Les neutrophiles ont été incubés en présence ou en absence de stimuli ou d'inhibiteurs pour les temps désirés, tel qu'indiqué. L'ARN total a été extrait selon la procédure modifiée de Chomczynski et Sacchi puis analysé par RPA tel que décrit précédemment utilisant les sondes de BD Pharmingen (Mississauga, Ontario, Canada). (Chomczynski P. *et al.*, 1987; McDonald PP. *et al.*, 1999)

### **ELISA**

Les neutrophiles ( $3 \times 10^6$  cellules /600µl) ont été cultivés dans des plaques de 12 puits à 37°C sous une atmosphère de 5% CO<sub>2</sub> en présence ou en absence de stimuli et/ou d'inhibiteurs, pour les temps indiqués. Les surnageants cellulaires aussi bien que les cellules ont été soigneusement prélevés, congelés rapidement dans l'azote puis entreposés à -80°C. Les concentrations de cytokines et chimiokines ont été déterminées par ELISA « sandwich », utilisant les anticorps de capture et de détection de R&D Systems. La limite de détection de ces ELISA est de 10pg/ml.

## Résultats et discussions

### **Section 1. L'expression des cytokines inflammatoires chez les neutrophiles humains est indépendante de la voie de signalisation JNK/AP-1**

Cloutier A., Ear T., Borissevitch O., Larivée P. and McDonald PP. Inflammatory Cytokine Expression Is Independent of the JNK/AP-1 Signaling Cascade in Human Neutrophils. *J.Immunol.*, Vol.171., October 1 2003.

Le présente section représente nos travaux dans le cadre du rôle d'AP-1 dans l'induction génique chez les neutrophiles humains. L'article en question se trouve en annexe.

Dans la présente étude, nous avons investigué le rôle de la cascade JNK/AP-1 dans la production de cytokines et chimiokines inflammatoires chez les neutrophiles humains. En premier lieu, nous avons examiné la présence des membres de la famille des protéines Jun et Fos ainsi que leur localisation cellulaire.

### **Expression et distribution des protéines des familles Jun et Fos chez les neutrophiles stimulés ou non**

Afin de déterminer quels membres des familles Jun et Fos étaient présents chez les neutrophiles, des cellules non stimulées ont été bouillies dans du tampon d'échantillon (« sample buffer »), puis analysées par immunobuvardage de type Western en utilisant des anticorps spécifiques contre les membres des familles Jun/Fos. La figure 1A, nous montre que des quantités substantielles de JunD et c-Fos sont exprimées chez les neutrophiles, alors que la détection d'une très faible bande authentique de c-Jun requiert la migration d'extraits cellulaires totaux équivalant à  $4 \times 10^6$  neutrophiles (contrairement à  $0,5-1 \times 10^6$  pour les autres protéines). De plus, une bande immunoréactive majeure d'un poids apparent d'environ 60 kDa a été constamment détectée, et ce même en utilisant 2 anticorps différents dirigés contre c-Jun. Nous nous sommes questionnés quant à la rareté de c-Jun authentique et nous nous sommes demandés si la faible présence de cette protéine pourrait être la résultante d'une dégradation rapide médiée par le protéasome puisqu'il a été démontré que c-Jun pouvait être la cible de cette voie (ce qui est aussi vrai pour c-Fos). (Treier M. *et al.*, 1994; Ciechanover A. *et al.*, 1991) Dans notre cas, cette faible expression de c-Jun authentique chez les neutrophiles ne peut cependant être expliquée par une dégradation rapide médiée par le protéasome, car l'utilisation

d'inhibiteurs du protéasome tels que le MG-132 et MG-262 n'a pas permis de détecter plus efficacement la protéine c-Jun authentique (37 kDa). Qui plus est, la bande de haut poids moléculaire (60 kDa) réagissant très fortement avec notre anticorps a aussi été détectée sous ces conditions (Figure 2A. et non-montré). Pour ce qui est de JunB, FosB et Fra2, leur détection n'a été observée en aucun cas, même lorsque des extraits équivalant à  $3 \times 10^6$  cellules ont été migrés et que les films ont été délibérément surexposés. (Figure 1A et non-montré) Finalement, la figure 1B nous montre que plus de la moitié du contenu cellulaire de JunD et de c-Fos était encore détectable après un traitement de deux heures à la cycloheximide. Ces protéines sont donc moins stables que les membres de la famille NF $\kappa$ B/Rel exprimés chez les neutrophiles, mais plus que la protéine I $\kappa$ B- $\alpha$  (McDonald PP. *et al.*, 1997 et figure 1B). Ainsi, les protéines Jun/Fos semble avoir une stabilité intermédiaire parmi les régulateurs transcriptionnels exprimés chez les neutrophiles.

Puisque plusieurs études avaient démontré que les ARNm encodant les membres des familles Jun/Fos s'accumulaient rapidement suite à une stimulation avec divers agonistes, nous avons examiné s'il y avait aussi une augmentation des protéines correspondantes. (Mollinedo F. *et al.*, 1991; Colotta F. *et al.*, 1987; Itami M. *et al.*, 1987; McColl SR. *et al.*, 1989; Bertani A. *et al.*, 1989) À cette fin, les neutrophiles ont été stimulés pour des durées variables (jusqu'à 4 heures) avec différents agonistes (jusqu'à 1  $\mu$ g/ml de LPS, 1000U/ml de TNF- $\alpha$ , 100nM fMLP, 50nM de PMA ou 1nM de GM-CSF), avant la détermination de leur contenu cellulaire en protéines Jun/Fos par immunobuvardage de type Western. Étonnamment, les quantités cellulaires de c-Jun, de JunD et de c-Fos n'ont pas été affectées par ces stimulations, même en présence de MG-

132, tel que démontré dans la figure 2A pour les stimulations au TNF- $\alpha$  et au PMA. De façon similaire, JunB, FosB et Fra2 sont demeurées indétectables (résultats non montrés). Finalement, en réponse au PMA, une bande migrant plus lentement de c-Fos a été constamment détectée (Figure 2A), laquelle représente probablement une forme phosphorylée de c-Fos. Cette même bande a aussi été détectée lors de co-stimulations avec le MG-132 et le TNF- $\alpha$ , d'une intensité toutefois plus faible (Figure 2A).

Considérant que les neutrophiles expriment fortement les messagers de nombreux membres des familles Jun/Fos, il est, tel que mentionné plutôt, très surprenant de ne pas détecter la protéine c-Jun authentique de 37 kDa, dont la présence est observée aisément chez la lignée de lymphocytes T Jurkat et chez les monocytes en utilisant le même protocole (figure 1A et résultats non montrés). De plus, de précédentes études ont démontré que les neutrophiles exprimaient constitutivement des quantités plus élevées des messagers c-Fos, c-Jun et JunD comparativement aux monocytes. (Heidorn K. *et al.*, 1987; Mollinedo F. *et al.*, 1991; Colotta F. *et al.*, 1987; Bertani A. *et al.*, 1989; Kreipe H. *et al.*, 1987) Alors que ces derniers présentent de plus grandes quantités cellulaires des protéines correspondantes, ceci étant particulièrement évident dans le cas de c-Jun. (Nos résultats non publiés) Ces observations suggèrent fortement que les protéines Jun/Fos sont traduites inefficacement chez les neutrophiles, ce qui pourrait contribuer à la stabilité relativement élevée des protéines c-Fos et JunD, tel que déterminé dans nos expériences avec la cycloheximide.

Même si différents agonistes n'ont causé aucun changement dans les quantités cellulaires des membres des familles Jun/Fos, nous avons examiné la possibilité que la distribution cellulaire de ces protéines soit affectée suite à une stimulation. Dans cette



optique, des fractions cellulaires de neutrophiles obtenues par cavitation à l'azote ont été analysées par immunobuvardage de type Western; cette technique permet d'obtenir des extraits cytoplasmiques exempts de protéines nucléaires, et vice-versa. (McDonald PP. *et al.*, 1997; McDonald PP. *et al.*, 1998) La figure 2B nous montre que JunD et c-Fos sont principalement cytoplasmiques, mais de faibles quantités de c-Fos sont détectables dans le noyau. Des stimulations diverses n'ont pas affecté de façon significative la distribution de ces protéines, tel que montré pour le PMA et le TNF- $\alpha$  dans la figure 2B. Ceci étant dit, il est intéressant de mentionner que la bande c-Fos migrant plus lentement (probablement une forme phosphorylée) n'a été détectée que dans le noyau et qu'avec le PMA. De façon similaire aux protéines Jun/Fos, la protéine kinase JNK1 est majoritairement cytoplasmique chez les neutrophiles, de très faible quantités étant détectées dans le noyau uniquement lorsque les films étaient surexposés. Une stimulation des neutrophiles n'a pas induit de translocation nucléaire de JNK1; du moins jusqu'à 60 min (Figure 3B et non-montré). Des résultats identiques ont été obtenus avec des neutrophiles adhérents (voir dans la section suivante le protocole de Avdi NJ. *et al.*; résultat non montré).

En somme, les protéines Jun/Fos et JNK1 sont majoritairement cytoplasmiques chez les neutrophiles, et la stimulation de ceux-ci avec différents agonistes ne provoque aucune translocation nucléaire des protéines Jun/Fos ou de JNK1.

### **Induction d'un complexe liant la séquence consensus AP-1 et activation de JNK1 chez les neutrophiles humains.**

Nous avons voulu par la suite déterminer si l'activation des neutrophiles avec de nombreux stimuli induisait une liaison à l'ADN des protéines AP-1. Les neutrophiles ont

été stimulés pour des temps variables (jusqu'à 90 min) avec du fMLP, du LPS, du TNF- $\alpha$ , du PMA, ou du GM-CSF avant la préparation des extraits nucléaires et l'analyse par EMSA. Sur 23 des 29 donneurs, un faible complexe constitutif liant la séquence AP-1 a été détectable dans les extraits de neutrophiles non stimulés, tel que nous avons rapporté précédemment. (McDonald PP. *et al.*, 1998b) Aucun des agonistes utilisés n'a toutefois pu induire une augmentation dans la liaison à l'oligonucléotide AP-1, tel que montré dans la figure 3A pour les neutrophiles stimulés au LPS, TNF- $\alpha$ , ou au GM-CSF. En fait, une diminution dans la liaison a même été observée à quelques occasions (12 sur 29 donneurs). Dans les mêmes conditions, la protéine kinase JNK1 n'a pas transloqué au noyau et n'est pas devenue phosphorylée (Figure 3B et résultat non-montré), ce qui est en accord avec de nombreuses études précédentes, lesquelles avaient démontré l'absence d'activation de JNK1 suite à diverses stimulations des neutrophiles (TNF- $\alpha$ , LPS, IL-1 $\beta$ , GM-CSF, G-CSF, ester de phorbol, PAF, fMLP, IL-8, particules phagocytaires opsonisées, irradiation aux UV, choc à la chaleur, stress chimique et hypertonicité). (McLeish KR. *et al.*, 1998; Suzuki K. *et al.*, 1999; Suzuki K. *et al.*, 2001; Nick JA. *et al.*, 1996; El Benna J. *et al.*, 1996; Nick JA. *et al.*, 1997; Krump E. *et al.*, 1997; Knall C. *et al.*, 1997; McLeish KR. *et al.*, 1998b; Frasch SC. *et al.*, 1998; Werz O. *et al.*, 2002) En comparaison, JNK1 devient phosphorylée suite à une stimulation au PMA chez les PBMC (Figure 3C).

Dans une récente étude, il a été montré que JNK1 devient phosphorylée en réponse à de fortes concentration de TNF- $\alpha$ , sous des conditions particulières chez les neutrophiles. (Avdi NJ. *et al.*, 2001) Brièvement, les neutrophiles ont été resuspendus à haute densité ( $20 \times 10^6/\text{ml}$ ), sédimentés pendant 55min à 37°C dans des tubes de

polypropylène, puis dilués à  $5 \times 10^6/\text{ml}$  et placés dans des pétris pour 25min, et enfin stimulés au TNF- $\alpha$ . Les cellules ainsi traitées sont référées comme des neutrophiles adhérents, ce protocole favorisant l'engagement des  $\beta_2$  intégrines. (Avdi NJ. *et al.*, 2001)

Nous avons été en mesure de reproduire ces résultats bien que l'activation de JNK1 (montrée par sa phosphorylation) était toujours modeste (Figure 4A) : Dans ces conditions, l'activation de JNK1 ne se produit qu'en réponse au TNF- $\alpha$ ; le LPS et les UV, des puissants activateurs connus de JNK, étant inefficaces pour des stimulations allant jusqu'à 30 min (Figure 4A et non montré). L'activation de JNK1 chez ces neutrophiles adhérents n'a cependant pas mené à la phosphorylation de c-Jun, tandis qu'une stimulation au TNF- $\alpha$  a induit la phosphorylation de c-Jun chez les monocytes autologues (Figure 4B). Nous nous attendions cependant à ne pas détecter de phospho-c-Jun chez les neutrophiles étant donné la faible présence de c-Jun authentique dans ces cellules. Nous avons toutefois voulu déterminer si en utilisant le protocole menant à une faible activation de JNK1, nous pouvions induire une augmentation de liaison d'AP-1 à l'ADN. Tel que présenté en figure 5A, ce protocole mène à une induction de liaison d'AP-1 à l'ADN. Cette induction demeure tout de même faible (nécessitant 6 jours d'exposition du gel) Cette augmentation de la liaison d'AP-1 à l'ADN, tout comme la phosphorylation de JNK1, n'ont été observées que chez les neutrophiles stimulés au TNF- $\alpha$ , et d'autres stimuli tels que le LPS, le fMLP, et le GM-CSF étant inefficaces. À des fins de comparaison, les mêmes extraits ont été analysés en EMSA avec l'oligonucléotide NF $\kappa$ B (Figure 5A, à droite); aucune différence n'a été constatée quant à la capacité du TNF- $\alpha$  à induire l'activation du NF $\kappa$ B selon que les neutrophiles étaient

adhérents (sédimentés, dilués et mis en culture dans des pétris) ou non (incubés dans des tubes de polypropylène).

La détection d'une augmentation dans la liaison d'AP-1 à l'ADN en réponse au TNF- $\alpha$  nous a incité à caractériser la nature du complexe inductible. Tel que démontré en figure 5B, l'analyse par « supershift » avec des anticorps dirigés contre les protéines des familles Jun/Fos a révélé que les anticorps contre JunD et c-Fos ont seulement déplacé une faible quantité du complexe AP-1, alors que les anticorps contre c-Jun et JunB ont été inefficaces. Nous avons toutefois trouvé que l'anticorps CREB1 (mais pas celui dirigé contre CREB2) déplaçait de façon majeure le complexe AP-1. Des résultats similaires ont été observés en utilisant les neutrophiles non adhérents. Puisque notre anticorps contre CREB1 peut aussi reconnaître la protéine ATF1 (selon les indications de notre fournisseur), nous nous sommes assurés qu'il ne s'agissait pas d'ATF-1 en utilisant un autre anticorps dirigé contre ATF-1, celui-ci ne reconnaissant pas CREB1. Des analyses par immunobuvardage de type Western ont de plus confirmé la présence de CREB1 et de CREB2 chez les neutrophiles (résultats non montrés).

En résumé, chez les neutrophiles, on peut observer une faible induction de la liaison d'AP-1 à l'ADN, uniquement lorsque les cellules sont adhérentes en concomitance d'un traitement au TNF- $\alpha$ . Ce protocole unique mène aussi à une faible phosphorylation de JNK1, cependant la phosphorylation du substrat principal de JNK1, c-Jun, n'a été en aucun cas observé. Le complexe AP-1 induit dans cette condition particulière, de même que celui observé constitutivement chez les neutrophiles non adhérents, est constitué majoritairement de la protéine CREB1, alors que c-Fos et JunD ne constituent qu'une proportion mineure de ce complexe. Puisqu'il n'existe aucune

évidence d'association des protéines Jun/Fos avec la protéine CREB1, un partenaire pour celui-ci reste à être identifié. À cet égard, il a été reporté que les protéines Jun, Fos et CREB peuvent interagir avec les protéines de la famille ATF, et même si ATF-1 ne semble pas impliqué dans notre cas, peut-être que les autres membres de cette famille le sont. (Hoeffler JP. *et al.*, 1991; Chinenov Y. *et al.*, 2001) De façon alternative, CREB 1 pourrait lier la séquence AP-1 en tant qu'homodimère. La possible phosphorylation de c-Fos quant à elle pourrait permettre à c-fos d'interagir avec d'autres facteurs transcriptionnels et d'avoir ainsi un rôle dans la transcription chez les neutrophiles. Il a été rapporté que c-Fos pouvait s'associer à p65/RelA, mais nous avons vérifié par supershift si des anticorps dirigés contre des protéines de la famille NF $\kappa$ B (RelA, c-Rel et p50) affectaient le complexe AP-1, et ceux-ci ont été incapables de déplacer le complexe AP-1 (résultats non publiés). (Stein B. *et al.*, 1993b)

### **Effet de l'inhibition du sentier de signalisation JNK chez les neutrophiles**

Même si nos résultats indiquent que le facteur transcriptionnel authentique AP-1 n'est pas impliqué dans l'activation transcriptionnelle chez les granulocytes, l'activation de JNK1 chez les neutrophiles adhérents (sédimentés) pourrait, quant à elle, de manière inconnue avoir un impact sur les événements transcriptionnels menant à l'expression génique dans ces cellules. Afin de clarifier cette situation, nous avons étudié les conséquences fonctionnelles d'un blocage de la signalisation de JNK chez les neutrophiles. À cette fin, nous avons pré-traité les neutrophiles avec un inhibiteur de JNK (SP600125), avant une stimulation avec soit du TNF- $\alpha$  ou du LPS, puis nous avons analysé l'expression génique des cytokines par « RNase Protection Assays ». (Bennett

BL. *et al.*, 2001) En accord avec de précédentes études, l'expression des gènes de l'IL-8, du TNF- $\alpha$ , de MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  a augmenté considérablement suite à une stimulation avec le TNF- $\alpha$  ou le LPS (Figure 6, colonnes grises). Le pré-traitement avec l'inhibiteur de JNK n'a pas affecté significativement l'expression des cytokines/chimiokines inflammatoires induites par ces agonistes chez les neutrophiles, et ce selon que les cellules soient adhérentes ou non (Figure 6 et résultats non-montrés). De la même façon, la synthèse et le relâchement des cytokines/chimiokines par les neutrophiles stimulés au TNF- $\alpha$  ou au LPS n'ont pas été affectés par l'inhibiteur de JNK (Figure 7), la seule exception étant observée au niveau de la synthèse de Mip-1 $\beta$  (mais pas sur sa sécrétion) chez les neutrophiles adhérents stimulés au TNF- $\alpha$ .

Donc, un traitement avec l'inhibiteur de JNK SP600125 n'a pas diminué la génération des cytokines et chimiokines (IL-8, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$ ). Même qu'au contraire une augmentation de production est survenue dans bien des cas. La kinase JNK aurait-elle un rôle inhibiteur sur la synthèse des cytokines chez les neutrophiles ou bien est-ce que l'inhibiteur de JNK activerait d'autres voies de signalisation justifiant du même coup cette augmentation de synthèse? Dans tous les cas, il est certain que la voie de JNK ne favorise pas l'induction génique de ces cytokines et des chimiokines chez les neutrophiles. Une autre explication pour l'augmentation de la production de l'IL-8 et de Mip-1 $\alpha$  causée par l'inhibiteur de JNK pourrait être l'activation d'une autre voie de signalisation par l'inhibiteur tel que proposé dans un récent papier. En effet, il a été démontré que l'inhibiteur de JNK, le SP600125, utilisé à 20  $\mu$ M, activait le facteur de transcription CREB (phosphorylation et capacité de transactivation) et que cette activation serait médiée par l'activation de la kinase p38 chez la lignée cellulaire

pancréatique de souris MIN6. (Vaishnav D. et al., 2003) Dans notre cas, il est possible qu'il s'agisse du même événement cellulaire et que cette augmentation de production de cytokines soit médiée par le facteur de transcription CREB, présent chez les neutrophiles (Figure 5 et résultats non montrés).

Quant à savoir si l'activation de JNK observée chez les neutrophiles adhérents stimulés au TNF- $\alpha$  a un impact sur les processus cellulaires, cela reste encore ambigu pour l'instant. Avdi *et al.* ont proposé un lien entre l'activation de JNK et l'apoptose, mais des preuves formelles restent à être démontrées.

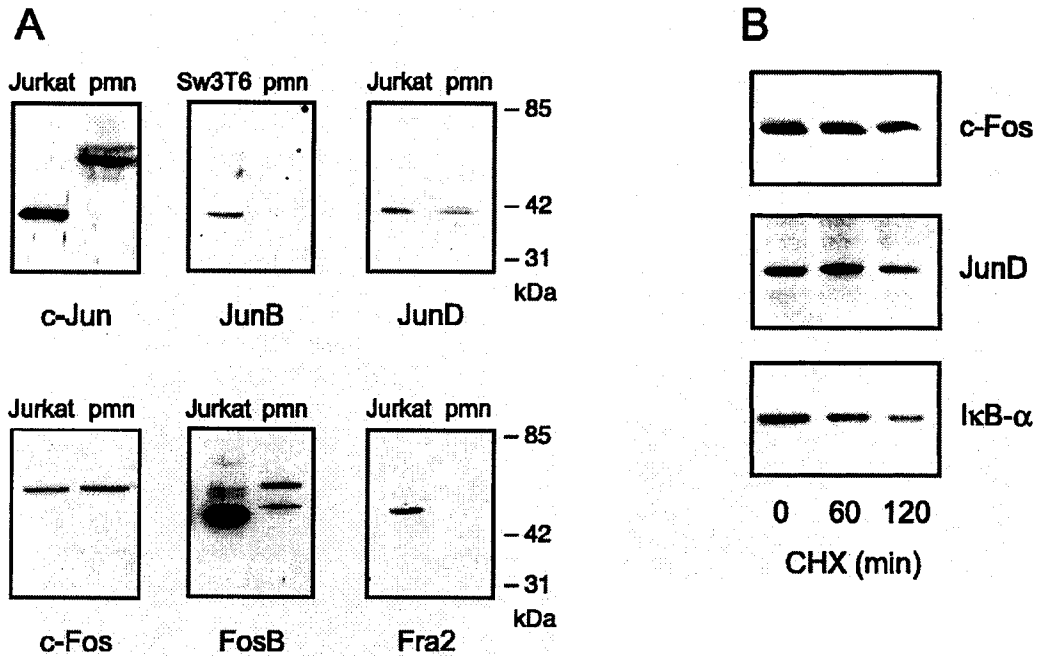
### **Expression de facteurs interagissant avec JNK et AP-1 chez les neutrophiles humains**

Dans le but d'explorer les raisons de la faible capacité d'induction de la cascade JNK/AP-1 chez les neutrophiles, nous avons vérifié si certains facteurs connus pour interagir avec JNK ou avec les protéines Jun/Fos étaient exprimés chez les neutrophiles. Un de ces facteurs est la protéine interagissant avec JNK (JIP-1), laquelle a été initialement proposée pour retenir JNK dans le cytoplasme. (Dickens M. *et al.*, 1997) Lorsque nous avons examiné si la protéine était exprimée chez les neutrophiles, JIP-1 n'a pas été détectée; nous avons toutefois eu des difficultés à trouver une lignée cellulaire qui aurait pu servir de contrôle positif (résultats non-montrés). Le facteur rédox-1 (Ref-1 ou redox factor-1) est autre facteur pouvant interagir avec les membres de la voie AP-1. Il s'agit d'une protéine nucléaire activée par la thioredoxine, qui garde certains résidus des protéines Jun/Fos dans un état réduit et par le fait même empêche ceux-ci de lier l'ADN (Xanthoudakis S. *et al.*, 1992, Xanthoudakis S. *et al.*, 1992b, Xanthoudakis S. *et al.*, 1994, Hirota K. *et al.*, 1997). Par immunobuvardage de type Western, la présence de Ref-1 a été démontrée chez les neutrophiles non stimulés et une stimulation jusqu'à deux

heures avec du TNF- $\alpha$ , du LPS ou du PMA n'a pas affecté sa quantité cellulaire (neutrophiles adhérents ou non, figure 8A et résultats non montrés).

Puisqu'il a été récemment démontré que la différenciation *in vitro* des monocytes périphériques en macrophages menait à une diminution de la quantité protéique de Ref-1 et corrélait avec une diminution de l'activité d'AP-1, nous avons vérifié si un tel processus prenait place durant la différenciation granulocytaire (Monick, MM. *et al.*, 1999). À cette fin, nous avons utilisé la lignée promyélocytaire PLB-985, laquelle peut être différenciée en cellules ressemblant phénotypiquement et fonctionnellement aux neutrophiles suite à un traitement de 4 jours avec du DMSO 1,25%. Les PLB-985 ainsi traitées sont considérées « neutrophil-like ». Nous avons donc vérifié si le contenu cellulaire en Ref-1 chez les PLB-985 différenciées était diminué comparativement aux cellules non différenciées; une faible diminution a été observée tel que montré en figure 8B. Un fait plus marquant de cette différenciation cellulaire est la diminution de l'habileté à activer JNK1 suite à une stimulation avec du PMA ou des rayons UV chez les « neutrophil-like », alors que les niveaux de JNK1 sont restés pratiquement les mêmes (Figure'8B).

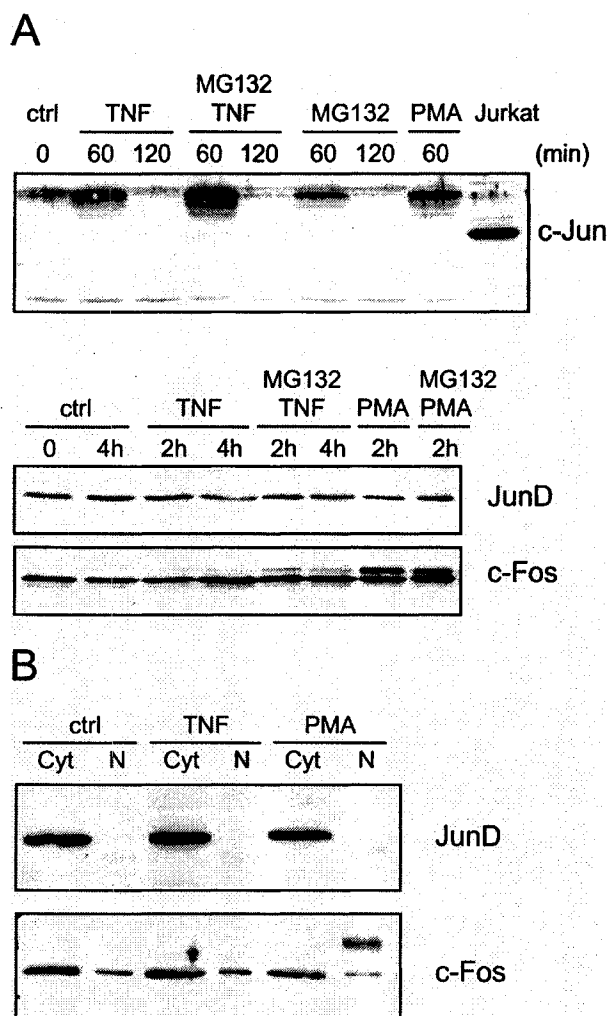




**Figure 1. Expression et stabilité des protéines des familles Jun/Fos chez les neutrophiles (pmn).**

A) Des extraits cellulaires totaux ont été analysés par immunoblot avec différents anticorps dirigés contre les membres de la famille AP-1 (à des fins de comparaison; extraits de Jurkat et de swiss3T6)

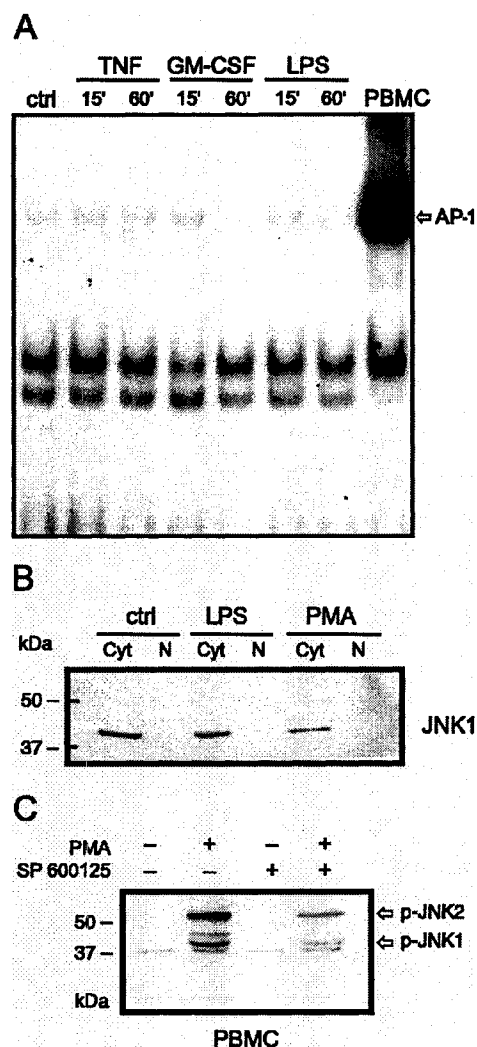
B) Stabilité des protéines déterminée par un traitement à la cycloheximide (20μg/ml)



**Figure 2. Effet d'agonistes sur les quantités cellulaires et sur la localisation des protéines Jun/Fos chez les neutrophiles (pmn).**

A) Les neutrophiles ont été pré-traités ou non avec un inhibiteur du protéasome (MG-132 15 $\mu$ M, 60min), puis stimulés jusqu'à 4h avec du TNF- $\alpha$  (1000U/ml) ou du PMA (50nM). Des extraits cellulaires totaux ont été analysés par immunoblot.

B) Les neutrophiles ont été stimulés 30 min, et la localisation cellulaire des protéines Jun/Fos a été analysée.

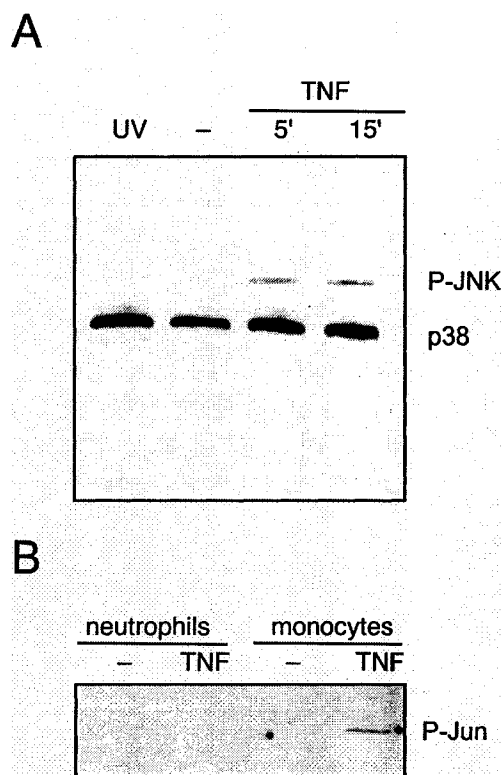


**Figure 3. Effet d'agonistes sur la liaison d'AP-1 à l'ADN et sur l'activité de JNK1 chez les pmn.**

A) Des extraits nucléaires de neutrophiles stimulés (15-60min) avec différents agonistes (TNF- $\alpha$  1000U/ml, LPS 1 $\mu$ g/ml ou GM-CSF 1nM) ont été analysés par EMSA. En comparaison, à l'extrême droite, un complexe AP-1 chez les PBMC stimulés au PMA.

B) Les neutrophiles ont été stimulés ou non avec du LPS 1 $\mu$ g/ml ou du PMA 50nM et la localisation cellulaire de JNK1 a été déterminée.

C) Des monocytes ont été stimulés ou non avec du PMA et l'activation de JNK(phosphorylation) a été analysée. Un pré-traitement avec l'inhibiteur de JNK (SP600125) bloque de façon considérable l'activation de JNK1

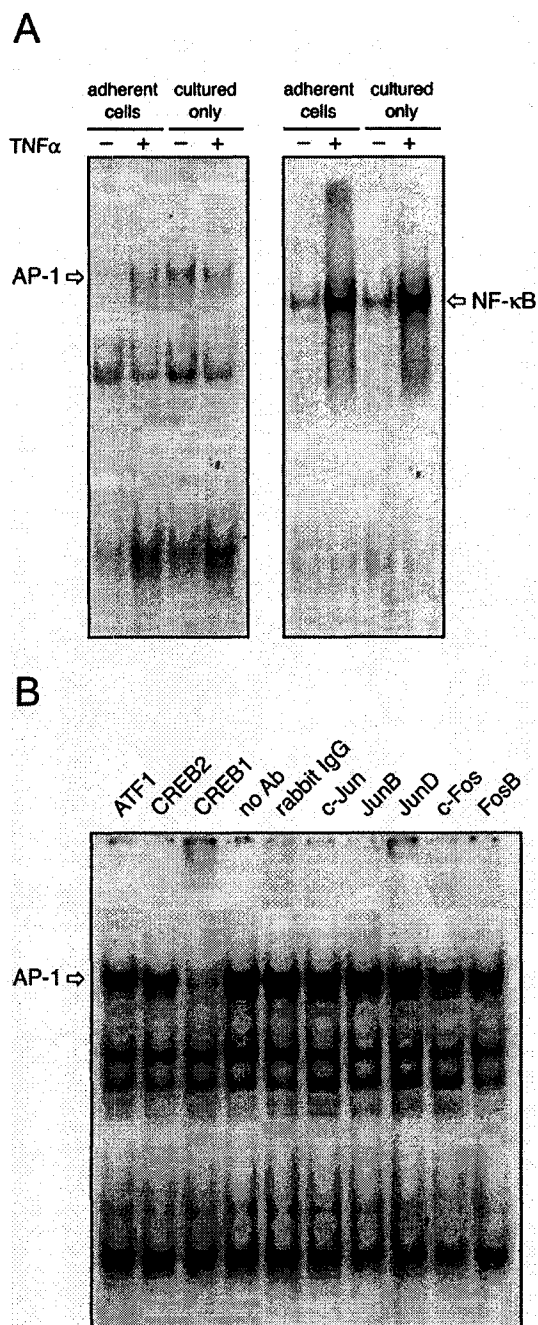


**Figure 4. Faible activation de JNK1 et absence de c-Jun phosphorylé dans des conditions permettant une modeste induction de la liaison à un site AP-1.**

Les neutrophiles ont été incubés tel que décrit par Avdi *et al.*, et des extraits cellulaires totaux ont été séparés sur SDS-PAGE et analysés par immunoblot.

A) Neutrophiles ( $2 \times 10^6$  cellules /puits) exposés aux UV pour 10 min, ou stimulés avec 5 ng/ml TNF- $\alpha$  pour 5 ou 15 minutes, puis analysés pour la présence de phospho-JNK par immunoblot. La membrane a été ensuite analysée avec un anticorps anti-p38 MAPK.

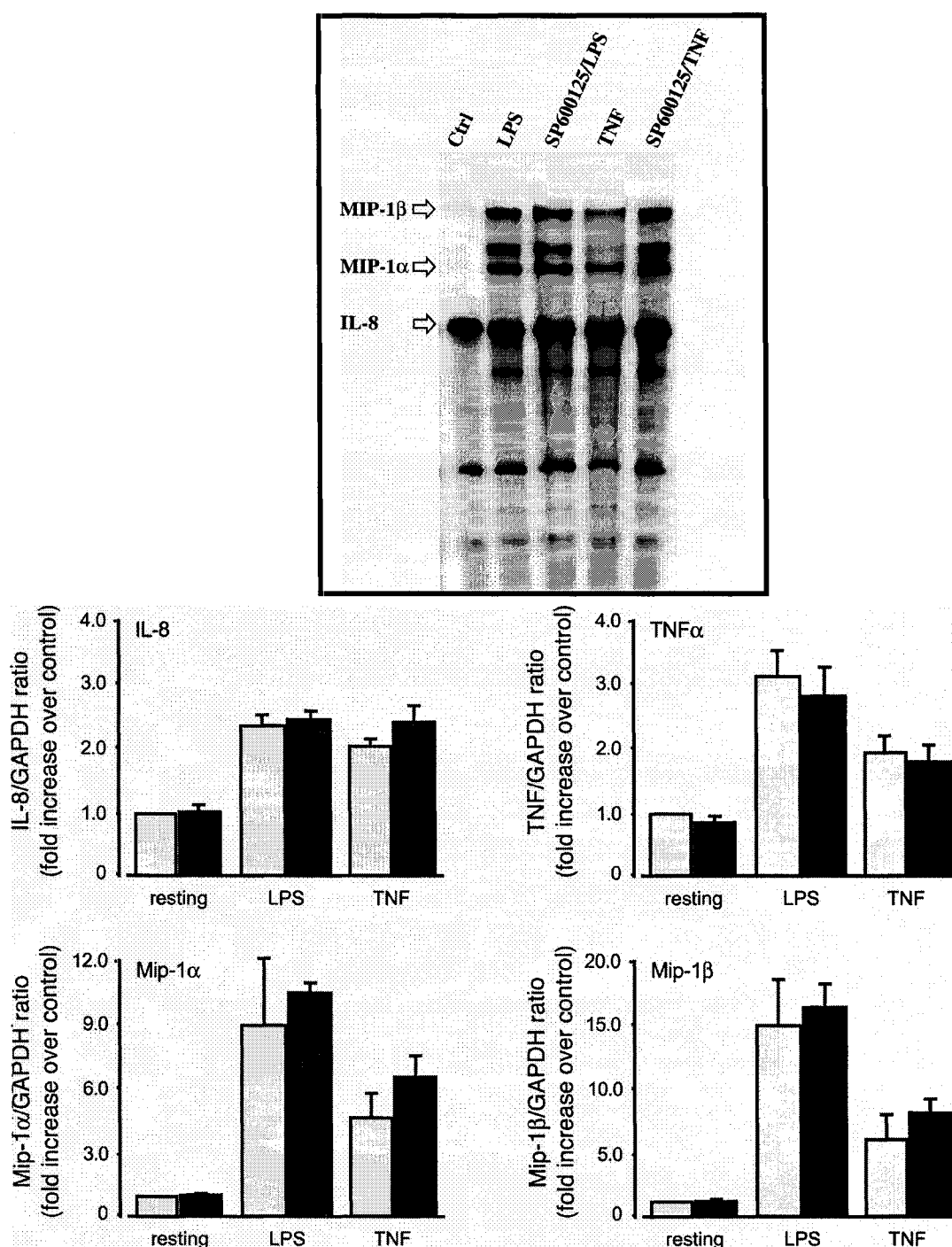
B) Neutrophiles ( $4 \times 10^6$  cellules/puits) ou monocytes autologues ( $1 \times 10^6$  cellules /puits) stimulées ou non avec 5 ng/ml TNF- $\alpha$  pour 15 min et analysés pour la présence de phospho-cJun par immunoblot.



**Figure 5. Induction et identification d'une activité liant un site AP-1 ne survient que dans des conditions très particulières, et demeure modeste.**

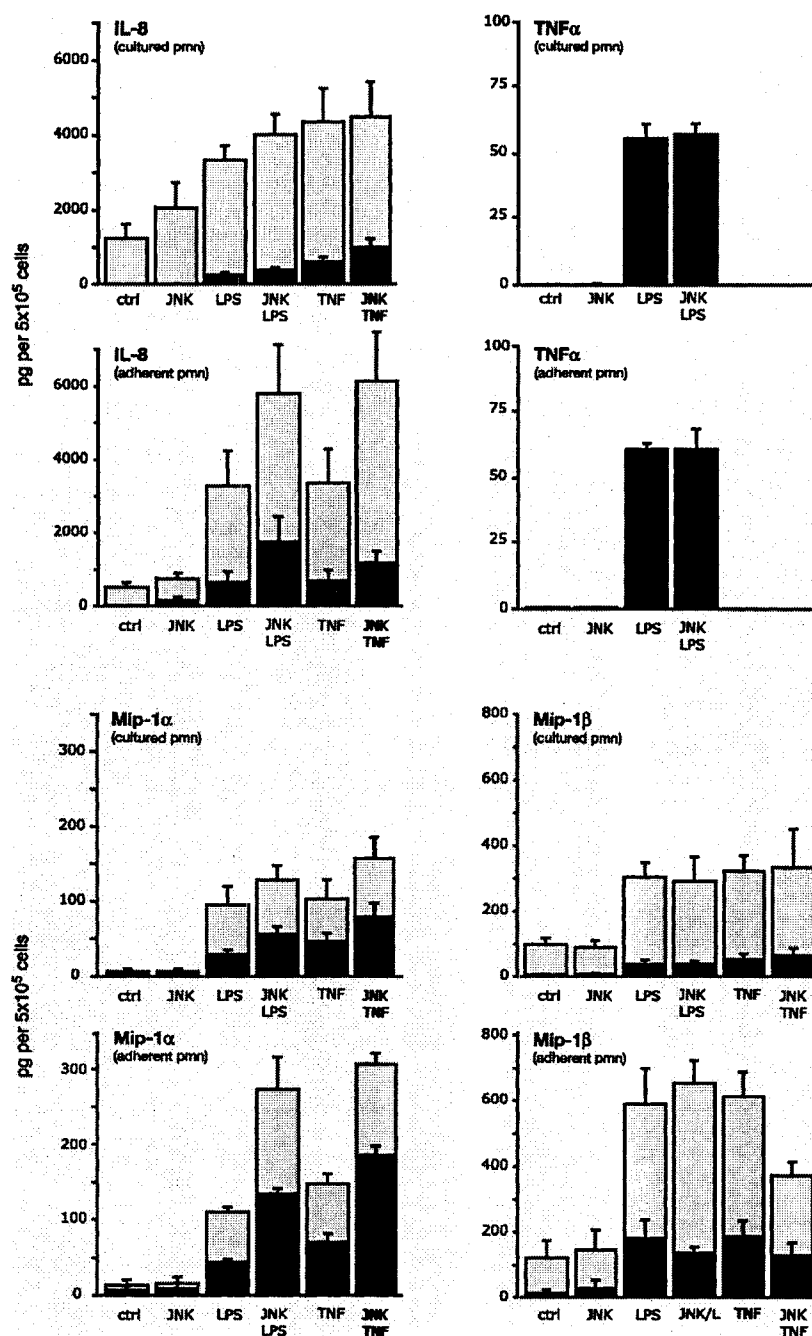
A) Des extraits nucléaires ont été analysés par EMSA avec une sonde AP-1 (panneau gauche) ou NFκB (panneau droit, à des fins de comparaison) à partir de neutrophiles incubés suivant deux protocoles différents, soit le protocole normal ou le protocole de Avdi *et al.* (neutrophiles adhérents, JBC 276:2189, 2001) et ensuite stimulés ou non avec TNF- $\alpha$  pour 10 min.

B) Des extraits nucléaires, préparés à partir de neutrophiles adhérents puis stimulés avec 5 ng/ml TNF- $\alpha$ , ont été analysés par EMSA avec une sonde AP-1 en présence de divers anticorps.



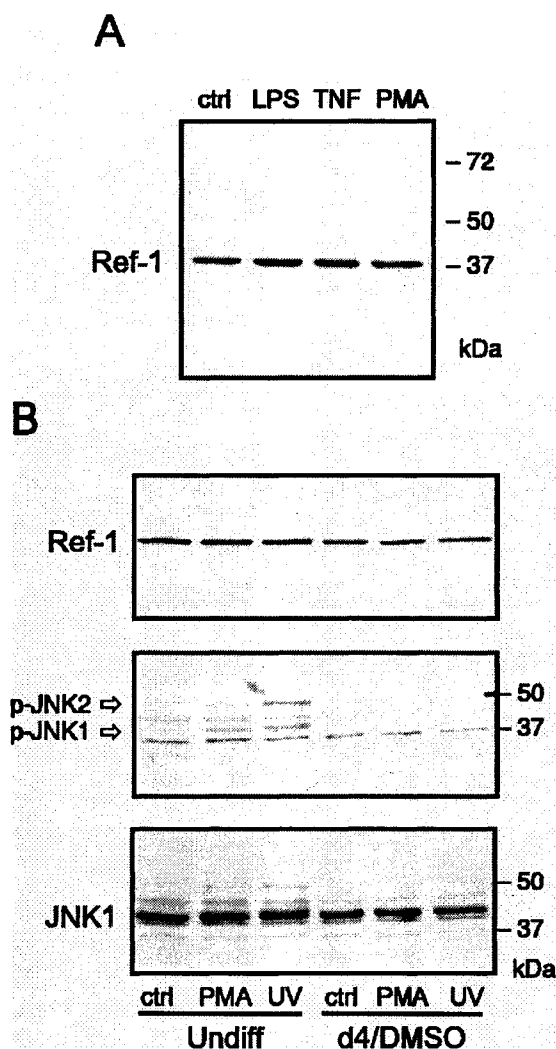
**Figure 6. Effet de l'inhibition de JNK sur l'expression des cytokines/chimiokines inflammatoires.**

Les neutrophiles ont été mis en culture en présence ■ ou en absence □ d'un inhibiteur sélectif de JNK (20μM SP 600125) pour 30 min et stimulé pour 60 min avec du LPS 1μg/ml ou TNF-α 1000U/ml. L'ARN total des cellules a été isolé et analysé par «RNase Protection Assays» (RPA). Dans l'encadré, un exemple de RPA est montré. Notez qu'il y a un peu moins d'ARN dans le puit avec le TNF-α, confirmé par les niveaux de GAPDH, non-montré ici. Par contre, la bande non-spécifique (dans le bas) témoigne du "loading".



**Figure 7. Effet de l'inhibition de JNK sur la synthèse et la sécrétion des cytokines et chimiokines inflammatoires chez les neutrophiles.**

Les neutrophiles ont été mis en culture selon le protocole normal ou selon le protocole de Avdi *et al.* JBC 2001, puis pré-traités ou non avec l'inhibiteur de JNK (SP600125) pour 30 min, et enfin stimulés avec du LPS ou du TNF-α pour 4 h. Par ELISA, le surnageant cellulaire ■ et les culots cellulaires ▨ ont été analysés pour leur contenu en cytokines/chimiokines.



**Figure 8. Expression de Ref-1 chez les neutrophiles primaires et durant la différenciation granulocytaire d'une lignée cellulaire promyéloïde humaine.**

A) Des extraits cellulaires totaux de neutrophiles stimulés ou non pendant 2 heures avec du TNF- $\alpha$  (100U/ml), du LPS (1 $\mu$ g/ml) ou du PMA (50nM) ont été analysés par immunobuvardage de type Western pour leur contenu en Ref-1.

B) Les cellules PLB-985 non différenciées ou différenciées 4 jours avec un traitement au DMSO 1,25% ont été aussi analysées pour leur contenu en Ref-1, mais aussi pour JNK1 et p-JNK.



## **Résultats et discussion**

### **Section 2. Étude des facteurs transcriptionnels C/EBP chez les neutrophiles**

La présente section englobe nos travaux sur les C/EBP chez le neutrophile humain.

Bien que cette étude ne soit pas encore terminée, nous vous présentons les résultats obtenus à ce jour.

## Expression des membres de la famille C/EBP

Afin de déterminer quels membres de la famille C/EBP sont présents chez les neutrophiles, des cellules non stimulées ont été bouillies directement dans le tampon d'échantillon (« sample buffer »), ou lysées dans une bombe à azote. Les échantillons ont été analysés par immunobuvardage de type Western et les protéines ont été détectées avec des anticorps spécifiques contre les différents isoformes de C/EBP. Dans la figure 1, on remarque la présence de C/EBP- $\alpha$  (p43 et p30), C/EBP- $\beta$  (LAP\*, LAP, LIP), C/EBP- $\delta$  et C/EBP- $\epsilon$  (p32, p30, p27 et p14) chez les neutrophiles. Ce profil d'expression suggère une implication fonctionnelle chez ces cellules. Suite à une stimulation avec du LPS (100ng/ml) ou du TNF- $\alpha$  (100U/ml) pendant 1, 2 et 4 heures, aucun changement dans les quantités protéiques de C/EBP- $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\epsilon$  n'a été observé (Figure 1). Bien qu'on ne puisse exclure qu'un changement dans l'expression se produise lors de stimulations de plus longue durée, la sécrétion des chimiokines étudiées (IL-8, MIP-1 $\alpha$  et MIP- $\beta$ ) se produit de 2 à 4 heures suite à la stimulation des neutrophiles par le LPS et le TNF- $\alpha$ . (Cassatella MA., 1999) Ceci donne à penser que la production inductible de chimiokines inflammatoires par les neutrophiles ne dépend pas de changement dans les niveaux cellulaire des protéines C/EBP, contrairement à d'autres types cellulaire comme les macrophages murins. (Cho Y. *et al.*, 2003) Ceci dit, il demeurerait intéressant de déterminer s'il y a un changement dans l'expression des C/EBP à plus longue échéance et si cela concorde avec un changement dans le patron d'expression génique des neutrophiles. En ce qui concerne C/EBP- $\delta$ , on détecte la protéine immédiatement après l'isolation des neutrophiles, cependant cette expression protéique est perdue dans le

temps, même en l'absence de stimulation. Ainsi, après 2 heures d'incubation sans stimulus, on ne détecte plus la protéine (Figure 1). Est-ce un phénomène normal chez le neutrophile ou bien est-ce la résultante d'une activation cellulaire lors de l'isolation des neutrophiles? À ce sujet, une susceptibilité à la dégradation a été démontrée pour les protéines C/EBP. Une étude a en effet démontré que différents isoformes C/EBP- $\beta$  pouvaient être générés et qu'ils étaient la résultante d'une dégradation lors du processus d'isolation des protéines nucléaires chez la lignée de macrophages murins P388D1. (Baer M. *et al.*, 2000) Toutefois, nous sommes convaincus que la dégradation du C/EBP- $\delta$  n'est pas induite par notre méthode d'isolation protéique puisque nous avons démontré qu'elle préserve l'intégrité des protéines C/EBP (données non-publiées), comme dans le cas des facteurs NF $\kappa$ B et STAT (McDonald PP. *et al.*, 1998) L'hypothèse d'une activation des neutrophiles via des interactions homotypiques des intégrines lors de l'isolation par Ficoll-Paque demeure envisageable. Il a d'ailleurs été démontré que le « cross-linking » de diverses intégrines (VLA-4,  $\alpha$ 3 $\beta$ 1,  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 et LFA-1) pouvait causer l'activation des C/EBP. (Dasgupta S. *et al.*, 2003; Fiorini E. *et al.*, 2000; Nakashima Y. *et al.*, 1999) Des interactions homotypiques entre les LFA-1 des neutrophiles pourraient possiblement activer le C/EBP- $\delta$  et favoriser sa dégradation. Enfin, il est connu que les C/EBP sont susceptibles à une dégradation par le protéasome. (Hattori T *et al.*, 2003, Shim M. *et al.*, 2003) Qui plus est, les inhibiteurs du protéasome peuvent induire l'expression de C/EBP- $\beta$  et de C/EBP- $\delta$ , de même que leur liaison à l'ADN chez une lignée de cellules humaines épithéliales (Caco-2). (Hungness ES. *et al.*, 2002) Dans l'optique de déterminer le mécanisme de cette disparition spontanée du C/EBP- $\delta$ , nous avons pré-traité les neutrophiles avec un inhibiteur du protéasome, le MG132, puis nous

avons stimulé ou non les neutrophiles avec du LPS ou du TNF jusqu'à 4 heures. Le pré-traitement a permis d'empêcher considérablement la perte d'expression. Est-ce que cet effet du MG132 sur l'expression de C/EBP- $\delta$  est entièrement imputable à une inhibition de sa dégradation, ou bien est-ce également dû à un changement dans la néo-synthèse du C/EBP- $\delta$ ? Pour répondre à cette question, des études de la stabilité des protéines C/EBP (Cycloheximide) seront entreprises.

Dans le cas particulier de l'isoforme C/EBP- $\gamma$ , sa détection n'a pu être constatée puisque nous n'avons pas d'anticorps contre cette protéine, un problème qui sera réglé sous peu. Nous nous attendons à en retrouver chez le neutrophile, car, dans une récente étude, Bjerregaard *et al.* ont détecté une présence massive de C/EBP- $\gamma$  chez les neutrophiles non stimulés. (Bjerregaard MD *et al.*, 2003) Ce dernier aspect est intéressant puisque tout récemment un rôle a été attribué au C/EBP- $\gamma$  dans l'induction génique de l'IL-8 et de l'IL-6 par le LPS chez les lignées de lymphocytes B de souris (P388 et WEHI-231). (Gao H. *et al.*, 2002,) Cette induction génique nécessiterait la formation d'un hétérodimère C/EBP- $\beta$ /C/EBP- $\gamma$ , et semblerait spécifique aux promoteurs de l'IL-6 et de l'IL-8 puisque cette régulation n'a pas été observée avec le promoteur du TNF- $\alpha$ . Des études que nous envisageons nous donneront de précieux indices à savoir si un phénomène semblable se produit chez les neutrophiles humains. L'expression de C/EBP- $\zeta$  a pu être détectée mais pour valider son expression, il nous faudra en refaire l'analyse. (Figure 2) La même étude citée ci-haut a aussi révélé la détection du C/EBP- $\zeta$  chez les neutrophiles non-stimulés. (Bjerregaard MD *et al.*, 2003). Des études restent à être effectuées pour déterminer si l'expression de C/EBP- $\zeta$  est modulable par des

agonistes. Normalement, son expression est induite lors de conditions produisant des stress cellulaires. (Maytin EV *et al.*, 2001)

### **Distribution des membres de la famille C/EBP**

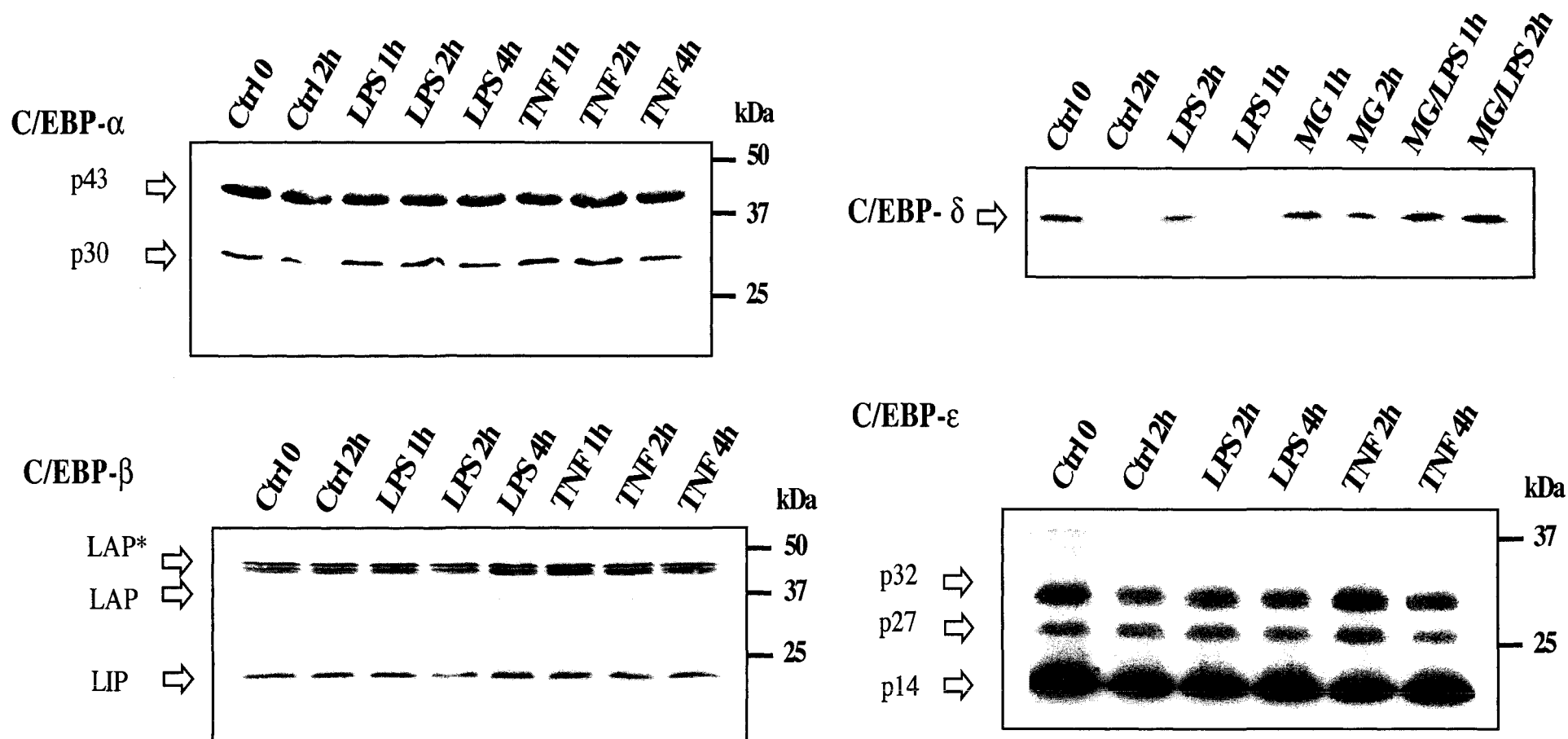
En un deuxième temps, nous avons voulu déterminer la localisation cellulaire des protéines C/EBP chez les neutrophiles. La figure 2 nous montre la distribution strictement nucléaire des isoformes C/EBP- $\beta$ , C/EBP- $\delta$  et C/EBP- $\zeta$  chez les neutrophiles. Des stimulations de 20 minutes avec le LPS ou le TNF- $\alpha$  n'ont pas affecté cette localisation, ou encore les quantités de protéines dans le noyau. Pour ce qui est de C/EBP- $\alpha$ , il apparaît que son expression soit plutôt cytoplasmique chez les neutrophiles humains (Figure 2, n=2) Suite à une stimulation de 20 minutes avec du TNF- $\alpha$  et du LPS, aucun mouvement nucléaire de la protéine n'a été observé. Pour ce qui est de C/EBP- $\epsilon$ , sa localisation reste à être démontrée. Dans la littérature, il y a beaucoup de divergences quant à la localisation des C/EBP. Chez certains types cellulaires, on observe une localisation nucléaire de certains isoformes C/EBP, tandis que dans d'autres ils sont cytoplasmiques. Suite à une stimulation au LPS ou au TNF- $\alpha$ , certains membres peuvent transloquer au noyau. (Cho Y. *et al.*, 2003; Yin M. *et al.*, 1996) Chez les neutrophiles, l'isoforme C/EBP- $\alpha$  (majoritairement p43) est cytoplasmique alors que les isoformes C/EBP- $\beta$  (LAP\*, LAP, LIP), C/EBP- $\delta$  et C/EBP- $\zeta$  sont déjà nucléaires. Lors de courtes stimulations ( $\leq 30$  minutes), aucun changement n'est observé. Il se peut toutefois qu'il y ait un mouvement de C/EBP- $\alpha$  ou une modification dans les quantités nucléaires de C/EBP- $\beta$ , C/EBP- $\delta$  et C/EBP- $\zeta$  lors de plus longues stimulations. Notre focus sur des temps précoces vient de ce que nous avons observé par la technique de

liaison à l'ADN (EMSA) : une induction d'un complexe C/EBP après 15-20 min ou moins. Dans un proche avenir, nous étendrons néanmoins nos analyses sur un plus long laps de temps.

### **Induction d'un complexe C/EBP liant l'ADN chez les neutrophiles**

Nous avons effectivement observé l'induction transitoire d'un complexe se liant à une séquence consensus C/EBP, ou à une séquence spécifique pour NFIL-6, suite à une stimulation de 15 minutes avec le LPS (100ng/ml) et TNF- $\alpha$  (100U/ml) (figure 3A et 3B). Ces résultats vont à l'encontre des résultats observés par deux autres groupes. (Tsutsumi-Ishii Y. *et al.*, 2000; Page SM. *et al.*, 1999) Ceux-ci avaient toutefois utilisé une technique générant habituellement des extraits nucléaires en partie dégradés. (McDonald PP. *et al.*, 1998; Cloutier A. *et al.* 2003) L'intensité du complexe C/EBP ou NFIL-6 est tout de même moins intense que celui observé avec NF $\kappa$ B suite à une stimulation avec les mêmes agonistes. (figure 3B) Après 20-30 minutes, on observe une diminution dans l'intensité du complexe lié à l'ADN. Cette diminution semble corrélérer temporellement avec la perte de l'expression du C/EBP- $\delta$ , bien que celle-ci se produit aussi sans stimulation. Il se peut que la formation du complexe observé par EMSA soit constitué en partie de C/EBP- $\delta$  et que sa perte d'expression protéique suite à une activation quelconque (LPS ou TNF- $\alpha$ ) altère le complexe. À la figure 3A, on peut remarquer les complexes C/EBP induits avec des extraits nucléaires de cellules RAW 264 (stimulé au LPS) et THP-1 (stimulé au TNF- $\alpha$ ). Le complexe observé chez les RAW264 stimulés au LPS est formé des protéines C/EBP- $\beta$  et C/EBP- $\delta$ , tandis que ceux induits chez les THP-1 stimulés au TNF- $\alpha$  sont plutôt formés majoritairement de C/EBP- $\alpha$  et

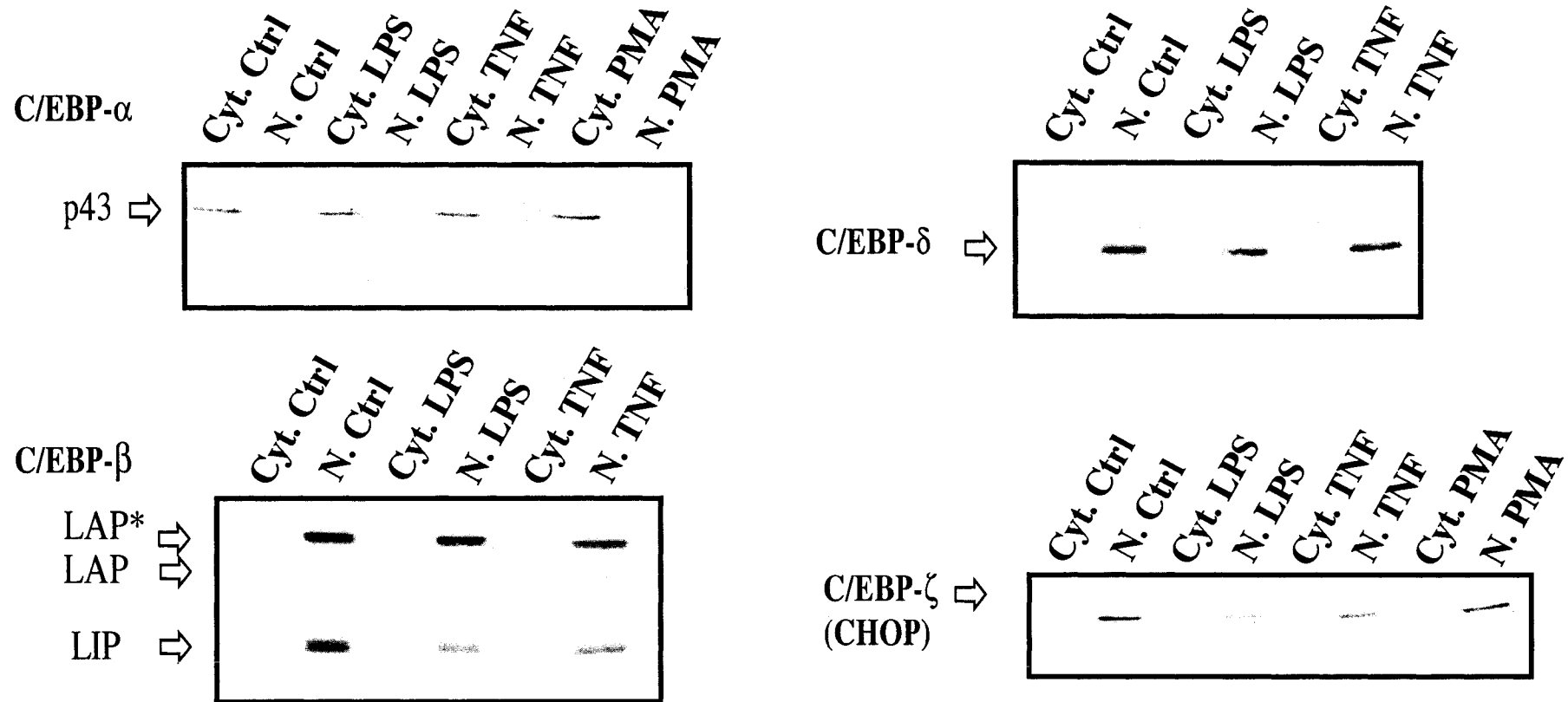
C/EBP- $\epsilon$  ainsi que de façon plus faible par C/EBP- $\delta$  (Cho Y. *et al.*, 2003; Reddy KV. *et al.*, 2003) Sur la base de ces études et sur les résultats présentés en figure 3A, il est permis de spéculer que les protéines formant le complexe avec les extraits nucléaires de neutrophiles stimulés avec le LPS ou le TNF- $\alpha$  seraient probablement des isoformes de C/EBP- $\beta$  et de C/EBP-  $\delta$ . Afin d'affirmer définitivement la nature dudit complexe, des analyses par « Supershift » seront nécessaires. Celles-ci révéleront de façon définitive la nature du complexe C/EBP inducible chez les neutrophiles. Chez les PLB-985, une lignée promyéloïde qu'il est possible de différencier en granulocytes semblables aux neutrophiles (*neutrophil-like*), nous avons aussi observé l'induction d'un complexe C/EBP suite à la stimulation avec le LPS (100 ng/ml), de même que l'induction d'un complexe NF- $\kappa$ B (figure 4). Dans un proche avenir, nous déterminerons si cette induction a également lieu chez les PLB-985 différenciés *neutrophil-like*. Le cas échéant, ceci pourrait nous aider à cerner les mécanismes participant à l'induction des C/EBP, par exemple en transfectant des formes dominantes négatives de certains C/EBP, ou encore de kinases soupçonnées de contribuer à l'activation transcriptionnelle des C/EBP.



**Figure 1. Expression des protéines de la famille des C/EBP chez les neutrophiles (pmn) et effet de diverses stimulation sur leurs quantités cellulaires**

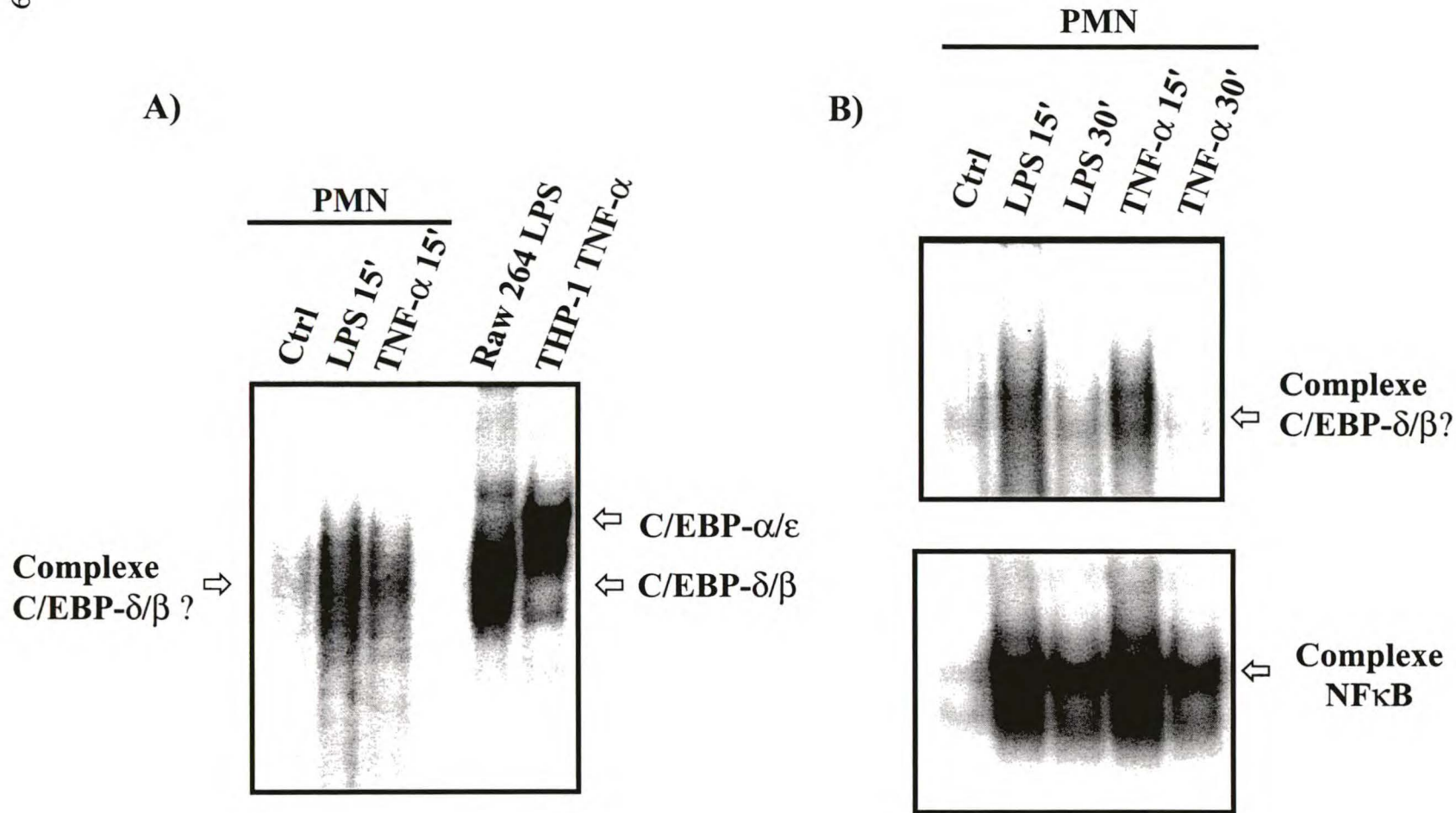
Des extraits cellulaires totaux ont été analysés par immunoblot avec différents anticorps dirigés contre les membres de la famille C/EBP. Lors de stimulation (jusqu'à 4h) avec le LPS (100ng/ml) et le TNF- $\alpha$  (100U/ml), aucun changement dans les quantités protéiques des C/EBP-  $\alpha$ , -  $\beta$ , -  $\epsilon$  n'est observé. Dans le cas de C/EBP- $\delta$ , on observe une diminution de la quantité protéique dans le temps, et ce, même sans stimulation (n=10). La raison ? Cette dégradation est médiée par le protéasome puisqu'un pré-traitement avec le MG-132 inhibe celle-ci.





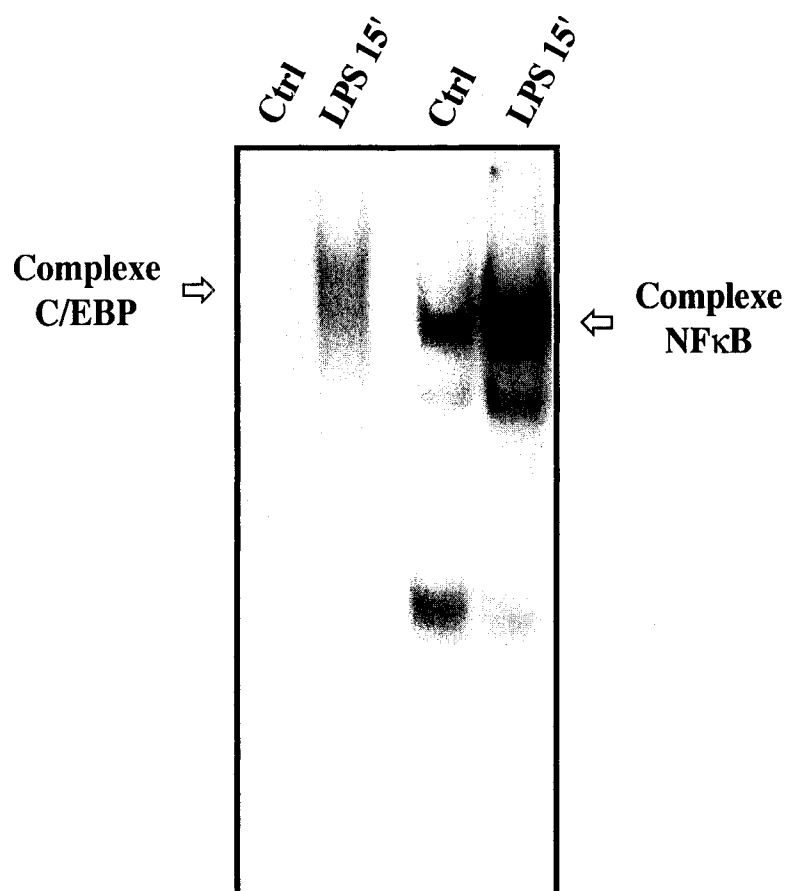
**Figure 2. Effet d'agonistes sur la localisation des protéines C/EBP chez les neutrophiles (pmn)**

Les neutrophiles ont été stimulés 15min, et la localisation cellulaire des protéines C/EBP a été analysée. On remarque que la localisation de C/EBP-α (p43) est cytoplasmique alors que les différents isoformes de C/EBP-β, C/EBP-δ et C/EBP-ζ sont strictement nucléaires. Les différents agonistes utilisés n'ont aucun effet sur la localisation cellulaires des C/EBP chez les pmn à des temps précoces (15-30min).



**Figure 3. Induction d'une activité liant un site C/EBP suite à une stimulation chez les neutrophiles (pmn)**

Des extraits nucléaires de neutrophiles stimulés avec du LPS 100 ng/ml ou du TNF- $\alpha$  100U/ml ont été analysés par EMSA avec un oligonucléotide contenant la séquence consensus C/EBP (A) ou un oligonucléotide contenant la séquence NF-IL-6 (C/EBP- $\beta$ ) (B). En A), à des fins de comparaison, des extraits nucléaires des lignées cellulaires RAW 264 (LPS) et THP-1 (TNF), ont été co-migrés avec les extraits nucléaires de pmn. En B) à des fins de comparaison, les extraits analysés pour la liaison de C/EBP ont aussi été analysés pour la liaison de NF $\kappa$ B.



**Figure 4. Induction d'une activité liant un site C/EBP et NFκB suite à une stimulation au LPS chez les PLB-985 non différenciées.**

Des extraits nucléaires de cellules PLB-985 non différenciées stimulées ou non au LPS (100ng/ml, 15 min) ont été analysés par EMSA pour leur activité C/EBP et NFκB.

## Discussion et Conclusion générale

Les résultats présentés dans ce mémoire nous renseignent quant à la participation des facteurs de transcriptions AP-1 et C/EBP dans l'induction génique chez les neutrophiles. Dans la première section, nous avons clairement démontré l'absence de participation du sentier de signalisation JNK/AP-1 dans la génération de cytokines et de chimiokines (TNF- $\alpha$ , IL-8, MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$ ) chez ces cellules. L'incapacité d'activer JNK chez les neutrophiles avait été démontrée précédemment à plusieurs reprises, sauf dans le cas de neutrophiles adhérents stimulés par de très fortes doses de TNF, situation qui ne menait par ailleurs qu'à une modeste activation de JNK. Nous avons, pour notre part, confirmé ces données et démontré que, même lorsqu'il y a activation de JNK, aucune activation du facteur AP-1 ne s'ensuit. De plus, l'étonnante absence de c-Jun chez les neutrophiles donne à penser qu'il y aurait peut-être une défectuosité dans la cascade JNK/AP-1 chez ces cellules, qui pourraient représenter un genre de «knock-out» fonctionnel d'AP-1.

Quoi qu'il en soit, la détection d'une bande de forte intensité (et de poids moléculaire élevé) avec divers anticorps dirigés contre c-Jun, demeure intrigante. Si cette bande est spécifique, comme elle semble l'être, il y a peut-être lieu de penser qu'il puisse s'agir d'une modification post-traductionnelle de c-Jun. À ce propos, la sumoylation semble une piste intéressante, eu égard au fait que c-Jun est susceptible de devenir sumoylée (Muller S. *et al.*, 2002). L'addition de SUMO sur plusieurs facteurs de transcription (NF $\kappa$ B, GR et C/EBP) affecte par ailleurs leur activité. (Kim J. *et al.*, 2002; Verger *et al.*, 2003) Nous étudions présentement cette possibilité.

Il a été démontré que le facteur AP-1 peut jouer un rôle important dans l'induction de l'expression de l'IL-8 et du TNF- $\alpha$  chez de nombreux types cellulaires. (Yasumoto K. *et*

*al.*, 1992; Sung SJ. *et al.*, 1991) Dans ce contexte, l'absence de participation d'AP-1 pour l'induction de l'IL-8 et du TNF- $\alpha$  chez les neutrophiles est des plus inattendues, et indique peut-être une dépendance accrue de l'expression de ces gènes envers NF $\kappa$ B. Cette défectuosité d'activation d'AP-1 pourrait enfin faire en sorte que des gènes connus pour être crucialement dépendants de ce facteur ne soient pas exprimés par les neutrophiles, tel que discuté dans le cas du MCP-1 dans notre article paru dans *J. Immunology*.

À ce jour, en ce qui concerne les C/EBP, nos résultats brossent un tableau général de l'expression des membres de cette famille, et documentent qu'il est possible d'induire un complexe C/EBP suite à une stimulation avec le LPS ou le TNF- $\alpha$ . Ceci laisse présager une implication fonctionnelle de cette famille dans l'induction génique chez les neutrophiles. Nous vérifierons prochainement par EMSA si d'autres stimuli connus pour induire l'expression de médiateurs inflammatoires chez les neutrophiles peuvent activer les C/EBP. Nous utiliserons aussi des inhibiteurs de protéines kinases connues pour participer dans l'activation des C/EBP, notamment des inhibiteurs de PKC (rottlerin, etc) et de ERK/MEK1 (PD98059). Cela nous permettra présumément d'identifier certains mécanismes d'activation des C/EBP chez ces cellules, et le cas échéant, nous renseignera davantage sur le rôle de ces facteurs transcriptionnels dans la production de chimiokines inflammatoires chez les neutrophiles.

En perspective, nous allons bientôt effectuer des études d'immunoprécipitation de la chromatine («ChIP assay») chez les neutrophiles. Cela risque de nous en apprendre beaucoup quant à la participation réelle des facteurs de transcription dans l'induction génique chez les neutrophiles. Actuellement, les études effectuées chez les neutrophiles

ne présentent qu'une corrélation entre l'activation de facteurs de transcription et l'induction de l'expression génique. Les études par «CHIP assay» nous permettront de détecter directement la liaison de facteurs transcriptionnels sur des promoteurs dans un contexte *in vivo* dans les neutrophiles. Cela nous permettra d'évaluer davantage l'importance réelle de certains facteurs transcriptionnels pour l'expression de gènes spécifiques chez le neutrophile.

## **Remerciements**

Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Patrick McDonald et le Dr. Pierre Larivée de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires. J'aimerais aussi remercier tous les membres de l'URP: Ginette, Marc, Diane, Claudia, Micheline, Nancy et Fred. J'aimerais remercier Olga et Thornin de m'avoir aidé au labo. De plus, j'aimerais remercier les étudiants en immunologie, de bons compagnons. J'aimerais spécialement remercier ma copine Chantal (pas de E) pour m'avoir aidé dans les derniers moments de cette maîtrise et qui a su me «botter le cul». Un merci tout spécial à mes parents, Michel et Jacqueline, et à mon frère Sébastien, qui ont su me guider dans la bonne direction et que j'aime beaucoup.

## Bibliographie

- Aderem A, Underhill DM. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.*, 17:593-623.
- Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. (2001) Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.*, 487(3):318-22
- Allen LA, Aderem A. (1996) Mechanism of phagocytosis. *Curr. Opin. Immunol.*, 8 :36-40
- Ali, S., A. C. Palmer, S. J. Fritchley, Y. Maley, and J. A. Kirby. (2001) Multimerization of monocyte chemoattractant protein-1 is not required for glycosaminoglycan-dependent transendothelial chemotaxis. *Biochem. J.*, 358:737.
- Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. (1988) The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell*, 55(5):875-85.
- Ansel, K. M., and J. G. Cyster. (2001) Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development. *Curr. Opin. Immunol.*, 13:172.
- Avdi NJ, Nick JA, Whitlock BB, Billstrom MA, Henson PM, Johnson GL, Worthen GS. (2001) Tumor necrosis factor- $\alpha$  activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway in human neutrophils. Integrin involvement in a pathway leading from cytoplasmic tyrosine kinases apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 276(3):2189-99.
- Baer M, Johnson PF. (2000) Generation of truncated C/EBP $\beta$  isoforms by in vitro proteolysis. *J. Biol. Chem.*, 275(34):26582-90.
- Baeuerle PA, Baltimore D. (1988) I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*, 242(4878):540-6.
- Baeuerle PA, Baltimore D. (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell*, 87(1):13-20.
- Baeuerle PA, Baltimore D. (1997) A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NFkappaB by I kappaB. *Genes. Dev.*, 3(11):1689-98.
- Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. (1997) Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.*, 15:675.
- Baggiolini, M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392:565.
- Bainton DT. (1992) Developmental biology of neutrophils and eosinophils In « Inflammation : Basic principles and clinical correlates» Gallin JI., Goldstein IM., Snyderman R. Editors., New York, Raven Press, 303-324.



Bannister AJ, Oehler T, Wilhelm D, Angel P, Kouzarides T (1995) Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene*, 11(12):2509-14.

Barkett M, Gilmore TD. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18(49):6910-24

Bazan, J. F., K. B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D. R. Greaves, A. Zlotnik, and T. J. Schall. (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 385:640.

Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M. (1991) Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J. Exp. Med.*, 173(3):771-4.

Beg AA, Baldwin AS Jr. (1994) Activation of multiple NFkappaB/Rel DNA-binding complexes by tumor necrosis factor. *Oncogene*, 9(5):1487-92.

Beg AA, Baltimore D. (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, 274(5288):782-4

Belperio, J. A., M. P. Keane, D. A. Arenberg, C. L. Addison, J. E. Ehlert, M. D. Burdick, and R. M. Strieter. (2000) CXC chemokines in angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.*, 68:1.

Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98(24):13681-6.

Berliner N. (1998) Molecular biology of neutrophil differentiation. *Curr. Opin. Hematol.*, 5(1):49-53

Bertani A, Polentarutti N, Sica A, Rambaldi A, Mantovani A, Colotta F. (1989) Expression of c-jun protooncogene in human myelomonocytic cells. *Blood*, 74(5):1811-6.

Bjerregaard MD, Jurlander J, Klausen P, Borregaard N, Cowland JB. (2003) The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow. *Blood*, 101(11):4322-32.

Blum MS, Toninelli E, Anderson JM, Balda MS, Zhou J, O'Donnell L, Pardi R, Bender JR (1997) Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am. J. Physiol.*, 273(1 Pt 2):H286-94.

Borish LC, Steinke JW. (2003) Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111(2 Suppl):S460-75.

- Borregaard N. (1996) Current concepts about neutrophil granule physiology. *Curr. Opin. Hematol.*, 3(1):11-8.
- Boyum A. (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 97 :77-89.
- Brivanlou AH, Darnell JE Jr. (2002) Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, 295(5556):813-8.
- Brown EJ, Bohnsack JF, Gresham HD. (1988) Mechanism of inhibition of immunoglobulin G-mediated phagocytosis by monoclonal antibodies that recognize the Mac-1 antigen. *J. Clin. Invest.*, 81(2):365-75.
- Browning DD, Pan ZK, Prossnitz ER, Ye RD. (1997) Cell type- and developmental stage-specific activation of NF-kappaB by fMet-Leu-Phe in myeloid cells. *J. Biol. Chem.*, 272(12):7995-8001.
- Cassatella MA. (1995b) The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today.*, 16(1):21-6.
- Cassatella MA, Gasperini S, Calzetti F, McDonald PP, Trinchieri G. (1995) Lipopolysaccharide-induced interleukin-8 gene expression in human granulocytes: transcriptional inhibition by interferon-gamma. *Biochem. J.*, 310 ( Pt 3):751-5.
- Cassatella MA. (1996) Interferon-gamma inhibits the lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory protein-1 alpha gene transcription in human neutrophils. *Immunol. Lett.*, 49(1-2):79-82.
- Cassatella MA. (1999) Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.*, 73:369-509.
- Celsus C., *Celsi di medicina libri VIII*. Ed. B. Fontius, Florentia 1478.
- Chinenov Y, Kerppola TK. (2001) Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*, 20(19):2438-52.
- Cho Y., Lee CH and Kim SG. (2003) Potentiation of lipopolysaccharide-inducible cyclooxygenase 2 expression by C2-ceramide via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of CCAAT/enhancer binding protein beta in macrophages. *Mol. Pharmacol.*, 63(3):512-23.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162(1):156-9.

- Ciechanover A, DiGiuseppe JA, Bercovich B, Orian A, Richter JD, Schwartz AL, Brodeur GM. (1991) Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88(1):139-43
- Ciechanover A. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.*, 17(24): 7151-60.
- Cloutier A, McDonald PP. (2003) Transcription factor activation in human neutrophils. *Chem. Immunol. Allergy.*; 83:1-23.
- Colotta F, Wang JM, Polentarutti N, Mantovani A. (1987) Expression of c-fos protooncogene in normal human peripheral blood granulocytes. *J. Exp. Med.*, 165(4):1224-9.
- Courey AJ, Jia S. (2001) Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev.*, 15(21):2786-96.
- D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F. (2003) Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J. Immunol. Methods.*, 273(1-2):3-13.
- Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. (1976) Neutrophil kinetics in man. *J. Clin. Invest.*, 58(3):705-15.
- Dasgupta S, Jana M, Liu X, Pahan K. (2003) Role of very-late antigen-4 (VLA-4) in myelin basic protein-primed T cell contact-induced expression of proinflammatory cytokines in microglial cells. *J. Biol. Chem.*, 278(25):22424-31.
- Deng T, Karin M. (1994) c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature*, 371(6493):171-5.
- Descombes P., Schibler U. (1991) A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell*, 67(3):569-79.
- Dickens M, Rogers JS, Cavanagh J, Raitano A, Xia Z, Halpern JR, Greenberg ME, Sawyers CL, Davis RJ. (1997) A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science*, 277(5326):693-6
- El Benna J., Han J, Park JW, Schmid E, Ulevitch RJ, Babior BM. (1996) Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch. Biochem. Biophys.*, 334(2):395-400.
- Escoubet-Lozach L., Glass CK., Wasserman SI. (2002) The role of transcription factors in allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 110(4):553-64.

- Ethuin F, Delarche C, Benslama S, Gougerot-Pocidalo MA, Jacob L, Chollet-Martin S. (2001) Interleukin-12 increases interleukin 8 production and release by human polymorphonuclear neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 70(3):439-46.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.*, 101(4):890-8.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, 405(6782):85-90.
- Fessler MB, Malcolm KC, Duncan MW, Worthen GS. (2002) A genomic and proteomic analysis of activation of the human neutrophil by lipopolysaccharide and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 277(35):31291-302.
- Fiorini E, Marchisio PC, Scupoli MT, Poffe O, Tagliabue E, Brentegani M, Colombatti M, Santini F, Tridente G, Ramarli D. (2000) Adhesion of immature and mature T cells induces in human thymic epithelial cells (TEC) activation of IL-6 gene transcription factors (NF-kappaB and NF-IL6) and IL-6 gene expression: role of alpha3beta1 and alpha6beta4 integrins. *Dev. Immunol.*, 7(2-4):195-208.
- Frasch SC, Nick JA, Fadok VA, Bratton DL, Worthen GS, Henson PM. (1998) p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 273(14):8389-97.
- Fuchs SY, Xie B, Adler V, Fried VA, Davis RJ, Ronai Z. (1997) c-Jun NH2-terminal kinases target the ubiquitination of their associated transcription factors. *J. Biol. Chem.*, 272(51):32163-8.
- Gao H, Parkin S, Johnson PF, Schwartz RC. (2002) C/EBP gamma has a stimulatory role on the IL-6 and IL-8 promoters. *J. Biol. Chem.*, 277(41):38827-37.
- Ghiran I, Barbashov SF, Klickstein LB, Tas SW, Jensenius JC, Nicholson-Weller A. (2000) Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J. Exp. Med.*, 192(12):1797-808.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 16:225-60.
- Gimbrone MA Jr, Obin MS, Brock AF, Luis EA, Hass PE, Hebert CA, Yip YK, Leung DW, Lowe DG, Kohr WJ. (1989) Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science*, 246(4937):1601-3.

- Godessart N, Kunkel SL. (2001) Chemokines in autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.*, 13(6):670-5.
- Guan Z, Tetsuka T, Baier LD, Morrison AR. (1996) Interleukin-1 beta activates c-jun NH2-terminal kinase subgroup of mitogen-activated protein kinases in mesangial cells. *Am. J. Physiol.*, 270(4 Pt 2):F634-41.
- Hanson RW. (1998) Biological role of the isoforms of C/EBP minireview series. *J. Biol. Chem.*, 273(44):28543.
- Hattori T, Ohoka N, Inoue Y, Hayashi H, Onozaki K. (2003) C/EBP family transcription factors are degraded by the proteasome but stabilized by forming dimer. *Oncogene*, 22(9):1273-80.
- Heidorn K, Kreipe H, Radzun HJ, Muller R, Parwaresch MR. (1987) The protooncogene c-fos is transcriptionally active in normal human granulocytes. *Blood*, 70(2):456-9.
- Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Kronke M, Ben Neriah Y, Baeuerle PA. (1993) Rapid proteolysis of I kappa Balpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappaB. *Nature*, 365(6442):182-5.
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.*, 7(11):2135-48.
- Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J. (1997) AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94(8):3633-8.
- Hoeffler JP, Lustbader JW, Chen CY. (1991) Identification of multiple nuclear factors that interact with cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activating transcription factor-2 by protein-protein interactions. *Mol. Endocrinol.*, 5(2):256-66.
- Holloway AF, Rao S, Shannon MF. (2002) Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. *Mol. Immunol.*, 38(8):567-80
- Hoogewerf, A. J., G. S. Kuschert, A. E. Proudfoot, F. Borlat, I. Clark-Lewis, C. A. Power, and T. N. Wells. (1997) Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*, 36:13570.
- Hsu, W., Kerppola, T. K., Chen, P. L., Curran, T. and Chen-Kiang, S. (1994) Fos and Jun repress transcriptional activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol. Cell. Biol.* 14 : 268-276.

- Hu J, Roy SK, Shapiro PS, Rodig SR, Reddy SP, Platanias LC, Schreiber RD, Kalvakolanu DV. (2001) ERK1 and ERK2 activate CCAAT/enhancer-binding protein-beta-dependent gene transcription in response to interferon-gamma. *J. Biol. Chem.*, 276(1):287-97.
- Hurme M, Matikainen S. (1993) Okadaic acid, a phosphatase inhibitor, enhances the phorbol ester-induced interleukin-1 beta expression via an AP-1-mediated mechanism. *Scand. J. Immunol.*, 38(6):570-4.
- Itami M, Kuroki T, Nose K. (1987) Induction of c-fos proto-oncogene by a chemotactic peptide in human peripheral granulocytes. *FEBS Lett.*, 222(2):289-92.
- Itoh K, Okubo K, Utiyama H, Hirano T, Yoshii J, Matsubara K. (1998) Expression profile of active genes in granulocytes. *Blood*, 92(4):1432-41.
- Jain R, Police S, Phelps K, Pekala PH. (1999) Tumour necrosis factor-alpha regulates expression of the CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBPs) alpha and beta and determines the occupation of the C/EBP site in the promoter of the insulin-responsive glucose-transporter gene in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.*, 338 ( Pt 3):737-43.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 20:197-216.
- Karin M, Ben-Neriah Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.*, 18:621-63.
- Karin M, Liu Z, Zandi E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 9(2):240-6.
- Karin M, Lin A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.*, 3(3):221-7.
- Kelner, G. S., J. Kennedy, K. B. Bacon, S. Kleyensteuber, D. A. Largaespada, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, J. F. Bazan, K. W. Moore, T. J. Schall. (1994) Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*, 266:1395.
- Kerppola TK, Curran T. (1993) Selective DNA bending by a variety of bZIP proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 13(9):5479-89.
- Kim J, Cantwell CA, Johnson PF, Pfarr CM, Williams SC. (2002) Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation. *J. Biol. Chem.*, 277(41):38037-44.
- Kinoshita S, Akira S, Kishimoto T. (1992) A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89(4):1473-6.

- Knall C, Worthen GS, Johnson GL. (1997) Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94(7):3052-7.
- Kobayashi SD, Voyich JM, Buhl CL, Stahl RM, DeLeo FR. (2002) Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99(10):6901-6.
- Kobayashi SD, Voyich JM, Somerville GA, Braughton KR, Malech HL, Musser JM, DeLeo FR. (2003) An apoptosis-differentiation program in human polymorphonuclear leukocytes facilitates resolution of inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 73(2):315-22.
- Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, DeLeo FR. (2003) Down-regulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.*, 170(6):3357-68.
- Koopmann, W., and M. S. Krangel. (1997) Identification of a glycosaminoglycan-binding site in chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha. *J. Biol. Chem.*, 272:10103.
- Kowenz-Leutz E, Twamley G, Ansieau S, Leutz A. (1994) Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes Dev.*, 8(22):2781-91.
- Kreipe H, Radzun HJ, Heidorn K, Mader C, Parwaresch MR. (1987) Human neutrophilic and eosinophilic granulocytes display different levels of c-fos proto-oncogene expression: an in situ hybridization study. *J. Histochem. Cytochem.*, 35(8):837-42.
- Krump E, Sanghera JS, Pelech SL, Furuya W, Grinstein S. (1997) Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 272(2):937-44.
- Kuschert, G. S., R. E. Hubbard, C. A. Power, T. N. Wells, and A. J. Hoogewerf. (1997) Solid-phase binding assay to study interaction of chemokines with glycosaminoglycans. *Methods. Enzymol.*, 287:369.
- Kuschert, G. S., F. Coulin, C. A. Power, A. E. Proudfoot, R. E. Hubbard, A. J. Hoogewerf, and T. N. Wells. (1999) Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry*, 38:12959.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259):680-5.

- Landschulz WH, Johnson PF, Adashi EY, Graves BJ, McKnight SL. (1998) Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev.*, 2(7):786-800.
- Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. (1989) The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science*, 243(4899):1681-8.
- Leclaire KP., Blumberg, M. A. and Sharp, P. A. (1992) The p50 subunit of NF- $\kappa$ B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 8145-8149.
- Lee W, Mitchell P, Tjian R. (1987) Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*, 49(6):741-52.
- Lekstrom-Himes JA. (2001) The role of C/EBP(epsilon) in the terminal stages of granulocyte differentiation. *Stem Cells.*, 19(2):125-33.
- Lenardo MJ, Baltimore D. (1989) NF- $\kappa$ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*, 58(2):227-9.
- Liebermann DA, Gregory B, Hoffman B. (1998) AP-1 (Fos/Jun) transcription factors in hematopoietic differentiation and apoptosis. *Int. J. Oncol.*, (3):685-700.
- Lin FT, MacDougald OA, Diehl AM, Lane MD. (1993) A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90(20):9606-10.
- Lloyd AR, Oppenheim JJ. (1992) Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol. Today.*, 13(5):169-72.
- Luther SA, Cyster JG. (2001) Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol.*, 2(2):102-7.
- Ma, Q., D. Jones, P. R. Borghesani, R. A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R. T. Bronson, and T. A. Springer. (1998) Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95:9448.
- Mackay CR. (2001) Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat. Immunol.*, 2(2):95-101.
- Maniatis T. (1999) A ubiquitin ligase complex essential for the NF- $\kappa$ B, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. *Genes Dev.*, 13(5):505-10.
- Marucha PT, Zeff RA, Kreutzer DL. (1991) Cytokine-induced IL-1 beta gene expression in the human polymorphonuclear leukocyte: transcriptional and post-transcriptional regulation by tumor necrosis factor and IL-1. *J. Immunol.*, 147(8):2603-8.



Maytin EV, Ubeda M, Lin JC, Habener JF. (2001) Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. *Exp. Cell. Res.*, 267(2):193-204.

McColl SR, Kreis C, DiPersio JF, Borgeat P, Naccache PH. (1989) Involvement of guanine nucleotide binding proteins in neutrophil activation and priming by GM-CSF. *Blood*, 73(2):588-91.

McDonald PP, Bald A, Cassatella MA. (1997) Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood*, 89(9):3421-33.

McDonald PP, Bovolenta C, Cassatella MA. (1998) Activation of distinct transcription factors in neutrophils by bacterial LPS, interferon-gamma, and GM-CSF and the necessity to overcome the action of endogenous proteases. *Biochemistry.*, (38):13165-73.

McDonald PP, Fadok VA, Bratton D, Henson PM. (1999) Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J. Immunol.*, 163(11):6164-72.

McLeish KR, Klein JB, Coxon PY, Head KZ, Ward RA. (1998a) Bacterial phagocytosis activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase cascades in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 64(6):835-44.

McLeish KR, Knall C, Ward RA, Gerwins P, Coxon PY, Klein JB, Johnson GL. (1998b) Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF. *J. Leukoc. Biol.*, 64(4):537-45.

Merika M, Thanos D. (2001) Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev.*, 11(2):205-8.

Messer G, Weiss EH, Baeuerle PA. (1990) Tumor necrosis factor beta (TNF-beta) induces binding of the NFkappa B transcription factor to a high-affinity kappa B element in the TNF-beta promoter. *Cytokine*, 2 (6):389-97.

Metchnikoff I. (1883) « Untersuchungen über die Mesodermalen Phagozyten einiger Wirbeltiere » , *Biol. Zent.bl.*, 3, 18, 560-565.

Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA (2002) Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood.*, 100(12):3853-60.

Miyamoto S, Maki M, Schmitt MJ, Hatanaka M, Verma IM. (1997) Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of I kappa B alpha is a signal for its degradation but not dissociation from NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91(26):12740-4.

- Mollinedo F, Vaquerizo MJ, Naranjo JR. (1991) Expression of c-jun, jun B and jun D proto-oncogenes in human peripheral-blood granulocytes. *Biochem. J.*, 273(Pt 2):477-9.
- Monick MM, Carter AB, Hunninghake GW. (1999) Human alveolar macrophages are markedly deficient in REF-1 and AP-1 DNA binding activity. *J. Biol. Chem.*, 18; 274(25):18075-80.
- Moser B, Loetscher P. (2001) Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.*, 2(2):123-8
- Muller S, Berger M, Lehembre F, Seeler JS, Haupt Y, Dejean A. (2000) c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.*, 275(18):13321-9.
- Muller WA. (2002) Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab. Invest.*, 82(5):521-33.
- Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J. (2002) Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell. Biol.*, 4(8):556-64.
- Murphy, P. M., M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim, and C. A. Power. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.*, 52:145.
- Musti AM, Treier M, Bohmann D. (1997) Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science*, 275(5298):400-2.
- Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, Akira S. (1993) Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90(6):2207-11.
- Nakashima Y, Sun DH, Trindade MC, Maloney WJ, Goodman SB, Schurman DJ, Smith (1999) Signaling pathways for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression in human macrophages exposed to titanium-alloy particulate debris in vitro. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 81(5):603-15.
- Nathan CF. (1987) Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 80(6):1550-60.
- Newburger PE, Subrahmanyam YV, Weissman SM. (2000) Global analysis of neutrophil gene expression. *Curr. Opin. Hematol.*, 7(1):16-20.
- Nick JA, Avdi NJ, Gerwins P, Johnson GL, Worthen GS. (1996) Activation of a p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 156(12):4867-75.

- Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Knall C, Gerwins P, Johnson GL, Worthen GS. (1997) Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *J. Clin. Invest.*, 99(5):975-86.
- Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. (2003) Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111(6):1185-99.
- Ossipow V, Descombes P, Schibler U. (1993) CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90(17):8219-23.
- Page SM, Gleich GJ, Roebuck KA, Thomas LL. (1999) Stimulation of neutrophil interleukin-8 production by eosinophil granule major basic protein. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 21(2):230-7.
- Pahl HL. (1999 ) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18(49):6853-66.
- Paul, W.E. (1999) *Fundamental immunology*. 4th edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishers; Chapitre 32, p1051-1066.
- Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M. (1988) A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*, 167(5):1547-59.
- Poli V, Mancini FP, Cortese R. (1990) IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell*, 63(3):643-53.
- Poli V. (1998) The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J. Biol. Chem.*, 273(45):29279-82.
- Hungness ES, Robb BW, Luo GJ, Pritts TA, Hershko DD, Hasselgren PO. (2002) Proteasome inhibitors activate the transcription factors C/EBP-beta and delta in human intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290(1):469-74.
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.*, 270(13):7420-6.
- Ramji DP, Vitelli A, Tronche F, Cortese R, Ciliberto G. (1993) The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP delta/NF-IL6 beta, are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. *Nucleic Acids Res.*, 21(2):289-94.

Ramji DP, Foka P. (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem. J.*, 365(Pt 3):561-75.

Reddy KV, Serio KJ, Hodulik CR, Bigby TD. (2003) 5-lipoxygenase-activating protein gene expression. Key role of CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) in constitutive and tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced expression in THP-1 cells. *J. Biol. Chem.*, 278(16):13810-8.

Renauld JC. (2001) New insights into the role of cytokines in asthma. *J. Clin. Pathol.*, 54(8):577-89.

Rollins, B. J. (1997) Chemokines. *Blood*, 90:909.

Rossi, D., Zlotnik A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 18:217.

Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.*, 177:195-203.

Schmitz ML, Baeuerle PA. (1991) The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J.*, 10(12):3805-17.

Schröder JM, Mrowietz U, Christophers E. (1988) Purification and partial biologic characterization of a human lymphocyte-derived peptide with potent neutrophil-stimulating activity. *J. Immunol.*, 140(10):3534-40.

Shim M, Smart RC. (2003) Lithium stabilizes the CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) through a glycogen synthase kinase 3 (GSK3)-independent pathway involving direct inhibition of proteasomal activity. *J. Biol. Chem.*, 278(22):19674-81.

Smith JA. (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.*, 56(6):672-86.

Smith MF Jr, Eidlen D, Brewer MT, Eisenberg SP, Arend WP, Gutierrez-Hartmann A. (1992) Human IL-1 receptor antagonist promoter. Cell type-specific activity and identification of regulatory regions. *J. Immunol.*, 149(6):2000-7.

Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP 3rd, Toews GB, Westwick J, Strieter RM. (1990) Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J. Clin. Invest.*, 86(6):1945-53.

Stein B, Baldwin AS Jr. (1993) Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.*, 13(11):7191-8.

Stein B, Baldwin AS Jr, Ballard DW, Greene WC, Angel P, Herrlich P. (1993b) Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J.*, 12(10):3879-91.

Strader, C. D., T. M. Fong, M. R. Tota, D. Underwood, and R. A. Dixon. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:101.

Strieter RM, Phan SH, Showell HJ, Remick DG, Lynch JP, Genord M, Raiford C, Eskandari M, Marks RM, Kunkel SL. (1989) Monokine-induced neutrophil chemotactic factor gene expression in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 264(18):10621-6.

Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Walz A, Opdenakker G, Van Damme J, Kunkel SL. (1995) Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J. Leukoc. Biol.*, 57(5):752-62.

Sugita S, Kohno T, Yamamoto K, Imaizumi Y, Nakajima H, Ishimaru T, Matsuyama T. (2002) Induction of macrophage-inflammatory protein-3alpha gene expression by TNF-dependent NF-kappaB activation. *J. Immunol.*, 168(11):5621-8.

Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC. (1993) NFkappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*, 259(5103):1912-5.

Sung SJ, Walters JA, Hudson J, Gimble JM. (1991) Tumor necrosis factor-alpha mRNA accumulation in human myelomonocytic cell lines. Role of transcriptional regulation by DNA sequence motifs and mRNA stabilization. *J. Immunol.*, 147(6):2047-54.

Suzuki K, Hino M, Hato F, Tatsumi N, Kitagawa S. (1999) Cytokine-specific activation of distinct mitogen-activated protein kinase subtype cascades in human neutrophils stimulated by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor-alpha. *Blood*, 93(1):341-9.

Suzuki K, Hino M, Kutsuna H, Hato F, Sakamoto C, Takahashi T, Tatsumi N, Kitagawa S. (2001) Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1beta. *J. Immunol.*, 167(10):5940-7.

Suzuki S, Kobayashi M, Chiba K, Horiuchi I, Wang J, Kondoh T, Hashino S, Tanaka J, Hosokawa M, Asaka M. (2002) Autocrine production of epithelial cell-derived neutrophil attractant-78 induced by granulocyte colony-stimulating factor in neutrophils. *Blood*, 99(5):1863-5.

Szekanecz Z, Kim J, Koch AE. (2003) Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Semin. Immunol.*, 15(1):15-21.

Torchia J, Glass C, Rosenfeld MG. (1998) Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 10(3):373-83.

Trautwein C, Caelles C, van der Geer P, Hunter T, Karin M, Chojkier M. (1993) Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature*, 364(6437):544-7.

Treier M, Staszewski LM, Bohmann D. (1994) Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell*, 78(5):787-98.

Tsukahara Y, Lian Z, Zhang X, Whitney C, Kluger Y, Tuck D, Yamaga S, Nakayama Y, Weissman SM, Newburger PE. (2003) Gene expression in human neutrophils during activation and priming by bacterial lipopolysaccharide. *J. Cell. Biochem.*, 89(4):848-61.

Tsutsumi-Ishii Y, Hasebe T, Nagaoka I. (2000) Role of CCAAT/enhancer-binding protein site in transcription of human neutrophil peptide-1 and -3 defensin genes. *J. Immunol.*, 164(6):3264-73.

Tweardy DJ, Wright TM, Ziegler SF, Baumann H, Chakraborty A, White SM, Dyer KF, Rubin KA. (1995) Granulocyte colony-stimulating factor rapidly activates a distinct STAT-like protein in normal myeloid cells. *Blood*, 86(12):4409-16.

Urban MB, Baeuerle PA. (1990) The 65-kD subunit of NF-kappa B is a receptor for I kappa B and a modulator of DNA binding specificity. *Genes Dev.*, 4 (11) :1975-84.

Urban MB, Baeuerle PA. (1991) The role of the p50 and p65 subunits of NF-kappa B in the recognition of cognate sequences. *New. Biol.*, 3(3):279-88.

Vaishnav D, Jambal P, Reusch JE, Pugazhenth S. (2003) SP600125, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase, activates CREB by a p38 MAPK-mediated pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307(4):855-60.

Vallejo, M., Ron, D., Miller, C. P. and Habener, J. F. (1993) C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CCAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, 4679-4683.

Verger A, Perdomo J, Crossley M. (2003) Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep.*, 4(2):137-42.

Wang P, Wu P, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. (1994) Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood*, 83(9):2678-83.

Wegner M, Cao Z, Rosenfeld MG. (1992) Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta. *Science*, 256(5055):370-3.

- Wells, T. N., and M. C. Peitsch. (1997) The chemokine information source: identification and characterization of novel chemokines using the WorldWideWeb and expressed sequence tag databases. *J. Leukoc. Biol.*, 61:545.
- Welm AL, Timchenko NA, Darlington GJ. (1999) C/EBPalpha regulates generation of C/EBPbeta isoforms through activation of specific proteolytic cleavage. *Mol. Cell. Biol.*, 19(3):1695-704.
- Werz O, Burkert E, Samuelsson B, Radmark O, Steinhilber D. (2002) Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, 99(3):1044-52.
- Westwick JK, Weitzel C, Minden A, Karin M, Brenner DA. (1994) Tumor necrosis factor alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase. *J. Biol. Chem.*, 269(42):26396-401.
- White M. (1999) Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 103(3 Pt 2):S378-81.
- Williams SC, Baer M, Dillner AJ, Johnson PF. (1995) CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *EMBO J.*, 14(13):3170-83.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and athophysiological aspects. *Lab. Invest.*, 80(5):617-53.
- Wojciak-Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley AJ. (1998). Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, 176(1):150-65.
- Xanthoudakis S, Curran T. (1992) Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J.*, 11(2):653-65.
- Xanthoudakis S, Miao G, Wang F, Pan YC, Curran T. (1992b) Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.*, 11(9):3323-35.
- Xanthoudakis S, Miao GG, Curran T. (1994) The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91(1):23-7.
- Yamanaka R, Kim GD, Radomska HS, Lekstrom-Himes J, Smith LT, Antonson P, Tenen DG, Xanthopoulos KG. (1997) CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94(12):6462-7.

Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida N, Murakami S, Mai M, Matsushima K. (1992) Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J. Biol. Chem.*, 267(31):22506-11.

Yin M, Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Chatterjee S, Diehl AM. (1996) Tumor necrosis factor alpha promotes nuclear localization of cytokine-inducible CCAAT/enhancer binding protein isoforms in hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 271(30):17974-8.

Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ. (1987) Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84(24):9233-7.

Zabel U, Henkel T, Silva MS, Baeuerle PA. (1993) Nuclear uptake control of NF-kappa B by MAD-3, an I kappa B protein present in the nucleus. *EMBO J.*, 12(1):201-11.

Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. (1997) The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell.*, 91(2):243-52.

Zhu S, Yoon K, Sterneck E, Johnson PF, Smart RC. (2002) CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(1):207-12.

Zlotnik A, Yoshie O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12(2):121-7



## **Annexes**

### **A) Activation des facteurs de transcription chez les neutrophiles humains**

Cloutier A. and McDonald PP.(2003) Transcription Factor Activation in Human Neutrophils. In *The Neutrophil : « An Emerging Regulator of Inflammatory and Immune Response »*. *Chemical Immunology and Allergy*. Vol. 83, p1-23.

La présente annexe résume les progrès faits dans l'élucidation des mécanismes transcriptionnels impliqués dans l'expression génique inductible chez les neutrophiles humains. L'accent est mis sur les facteurs de transcription déjà identifiés et partiellement caractérisés (NFκB et STAT) chez les neutrophiles, et ceux ayant une implication potentielle (AP-1, C/EBP, Ets).

### **B) L'expression des cytokines inflammatoires chez les neutrophiles humains est indépendante de la voie de signalisation JNK/AP-1**

Cloutier A., Ear T., Borissevitch O., Larivée P. and McDonald PP. Inflammatory Cytokine Expression Is Independent of the JNK/AP-1 Signaling Cascade in Human Neutrophils. *J.Immunol.*, Vol.171., October 1 2003.

**Cloutier, A., & McDonald, P. P. (2003). Transcription Factor Activation in Human Neutrophils. Dans *The Neutrophil : An Emerging Regulator of Inflammatory and Immune Response* (Chemical immunology and allergy, Vol. 83, p. 1-23). Karger Publishers. <https://doi.org/10.1159/000071553>**

**Cloutier, Alexandre, Ear, T., Borissevitch, O., Larivée, P., & McDonald, P. P. (2003). Inflammatory Cytokine Expression Is Independent of the c-Jun N-Terminal Kinase/AP-1 Signaling Cascade in Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*, 171(7), 3751-3761. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.7.3751>**